



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Zytokinartige Wirkungen von Laktoferrin in verschiedenen
Differenzierungsstadien von Caco-2 und THP-1 Zellen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:
Matrikel-Nummer:
Studienrichtung (lt. Studienblatt)
Betreuer:

Sigrun Badrnya
0101914
Ernährungswissenschaften
Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Manfred Hüttinger

Wien, am 31. Juli 2009

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Manfred Hüttinger nicht nur für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die interessante Themenstellung und die Möglichkeit als Tutorin der Biochemischen Übungen tätig zu sein, sondern auch für die Einführung in die eine oder andere kulinarische Welt bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Nina Zemann für die kompetente Betreuung, die Freiheit selbständig arbeiten zu dürfen und die Hilfestellung bei den Feinheiten der Formulierung und Formatierung. Ich habe nicht nur viel über Signaltransduktion, sondern auch über die Möglichkeiten von Photoshop oder die Organisation richtig guter Motto-Parties gelernt. Vielen Dank auch an Mag. Adolf Zemann für die Einführung in die Zellkultur, die angenehme Arbeitsatmosphäre und manch juristische Anekdote.

Bei der Gruppe von Prof. Dr. Hilde Laggner, vor allem bei Sabine und Natascha, möchte ich mich für die Bereitstellung der THP-1 Zellen, aber auch für die gemeinsamen Pausen, die Motivation und moralische Unterstützung herzlich bedanken.

Allen, die mich schon lange kennen, die ich vor oder während meiner Studienzeit kennengelernt habe, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und mir immer zur Seite gestanden haben: Ganz gleich wie – ohne Euch wäre es nicht dasselbe gewesen!

Widmen möchte ich diese Arbeit Günther, der mich nach so vielen Jahren noch überraschen kann und mich immer wieder dazu bringt, über mich selbst hinauszuwachsen.

I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
III	TABELLENVERZEICHNIS	VII
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERBLICK	3
2.1	Laktoferrin	3
2.2	Transforming Growth Factor beta1 (TGF- β 1)	5
2.2.1	TGF- β -Pathway	6
2.3	Disabled-proteine Dab1, Dab2	10
2.4	Wnt-/ β -Catenin-Pathway	12
2.5	Mitogen activated protein kinase- Pathway	14
2.6	LRP-1 - Low-density lipoprotein receptor-related protein-1	17
2.7	Matrix Metalloproteinasen	19
2.7.1	Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α)	20
3	MATERIAL UND METHODEN	22
3.1	Zellkultur	22
3.1.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	22
3.1.2	Sterile Arbeitsbedingungen	23
3.1.3	Zelllinien	23
3.1.3.1	Caco-2 Zellen	23
3.1.3.2	THP-1 Zellen	24
3.1.4	Zellkulturmedium	25
3.1.4.1	RPMI 1640	25
3.1.4.2	DMEM	25
3.1.5	Kultivierung der Zellen	25
3.1.6	Bestimmung der Zellzahl	26
3.1.7	Aussetzen der Zellen	26
3.1.8	Inkubation	27
3.2	Lysieren von Zellen	28

3.2.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	28
3.2.2	Lysieren von undifferenzierten THP-1 Zellen	28
3.2.3	Lysieren von Caco-2 und differenzierten THP-1 Zellen	29
3.3	Proteinbestimmung (Photometrisch)	30
3.3.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	30
3.3.2	Durchführung	30
3.4	Western Blot	31
3.4.1	SDS-Gelelektrophorese	31
3.4.1.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	31
3.4.1.2	Herstellung der Polyacrylamidgele	32
3.4.1.3	Vorbereitung der Proben	33
3.4.1.4	Beladung der Gele und Elektrophorese	33
3.4.2	Western Transfer Blotting	34
3.4.2.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	34
3.4.2.2	Durchführung	34
3.4.3	Immunodetektion	35
3.4.3.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	35
3.4.3.2	Durchführung	37
3.5	RNA-Isolierung - Reverse Transkription - cDNA-Synthese	38
3.5.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	38
3.5.2	RNA-Isolierung	39
3.5.3	Reverse Transkription - cDNA-Synthese	40
3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.6.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	41
3.6.2	Durchführung	42
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien	45
4.1.1	Vergleich von Caco-2 Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien	45
4.1.1.1	Expression ausgewählter Proteine in undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen	46

4.1.1.2	Expression ausgewählter Gene in undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen	47
4.1.2	Vergleich von THP-1 Zellen im Differenzierungsverlauf	50
4.1.2.1	Proteinexpression im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung	51
4.1.2.2	Genexpression im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen	54
4.1.2.3	Genexpression in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen	58
4.2	Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF-β1 auf die Signaltransduktion in verschiedenen Differenzierungsstadien von Caco-2 Zellen	60
4.2.1	Einfluss von bovinem Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Signal-transduktion und die Proteinexpression in subkonfluenten Caco-2 Zellen	64
4.2.2	Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression ausgewählter Gene in postkonfluenten Caco-2 Zellen	68
4.3	Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF-β1 auf die Signaltransduktion in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen	69
4.3.1	Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von PAI-1 in undifferenzierten THP-1 Zellen	72
4.3.2	Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression ausgewählter Zielgene in differenzierten THP-1 Zellen	73
5	DISKUSSION	74
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	ABSTRACT	87
V	LITERATURVERZEICHNIS	XI

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Grafische Darstellung des kanonischen TGF- β -Pathway.	8
Abbildung 2:	Grafische Darstellung des Wnt-/ β -Catenin-Pathway.	12
Abbildung 3:	Grafische Darstellung des MAPK-Pathway.	14
Abbildung 4:	Crosstalk zwischen TGF- β - und MAPK-Pathway.	15
Abbildung 5:	Struktureller Aufbau von LRP-1.	17
Abbildung 6:	Grafische Darstellung der NF- κ B-Aktivierung.	20
Abbildung 7:	Mikroskopische Darstellung der undifferenzierten THP-1 Monozyten und der durch PMA-Zusatz zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen.	24
Abbildung 8:	Aufbau des Western Blot Sandwich von oben nach unten.	34
Abbildung 9:	Proteinleiter als Referenzmarker für die Größenzuordnung der verwendeten Primär-Antikörper.	37
Abbildung 10:	Western Blot Grundsignale von p-p38, pERK1, pERK2, LRP-1, p-Dab2, β -Catenin und p-Smad2 in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.	46
Abbildung 11:	Expression des Differenzierungsmarkers Sucrase-Isomaltase in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.	47
Abbildung 12:	Expression von TGF- β 1 und TGF- β -(Co-)Rezeptoren in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.	47
Abbildung 13:	PCR-Grundsignale der Zielgene PAI-1, FN-1, MMP-1 und c-Myc in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.	48
Abbildung 14:	Grundlevel der β -Catenin- und LRP-5-Signale in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.	49
Abbildung 15:	PCR-Grundsignale von LRP-1, Dab1 und Dab2 in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.	49
Abbildung 16:	Mikroskopische Darstellung von THP-1 Zellen im Verlauf der Differenzierung.	50

Abbildung 17:	Western Blot Grundsignale der MAPKinasen p38, ERK1 und ERK2 in phosphorylierter Form im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung.	51
Abbildung 18:	Western Blot Grundsignal von p-Smad2 im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung.	52
Abbildung 19:	Western Blot Grundsignale von β -Catenin, LRP-1 und p-Dab2 im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen.	52
Abbildung 20:	Expression von TGF- β 1 und TGF- β -(Co-)Rezeptoren im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen.	53
Abbildung 21:	Grundsignale der Differenzierungsmarker CD-36, Endoglin, LRP-1 und MMP-9 sowie von MMP-2 im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung.	54
Abbildung 22:	PCR-Grundsignale von β -Catenin, LRP-5 und Dab2 im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung.	55
Abbildung 23:	Repräsentative Abbildung der Expression von PAI-1, FN-1 und MMP-1 im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen.	56
Abbildung 24:	Vergleich der Genexpression in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen.	57
Abbildung 25:	Effekt von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivierung von Smad2 in subkonfluenten und postkonfluenten Caco-2 Zellen.	59
Abbildung 26:	Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivierung der MAPKinasen p38, ERK1 und ERK2 in subkonfluenten und postkonfluenten Caco-2 Zellen.	61
Abbildung 27:	Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Expression von LRP-1, β -Catenin und p-Dab2 in postkonfluenten Caco-2 Zellen.	62
Abbildung 28:	Effekt von Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Aktivierung von Smad2 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.	63

Abbildung 29:	Effekt von Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Aktivierung der MAPKinasen p38, ERK1 und ERK2 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.	64
Abbildung 30:	Effekt von Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Aktivierung der MAPKinase p38 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.	66
Abbildung 31:	Einfluss von Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von β -Catenin und p-Dab2 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.	66
Abbildung 32:	Einfluss von Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von β -Catenin, LRP-1 und p-Dab2 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.	67
Abbildung 33:	Einfluss von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von PAI-1, FN-1, MMP-1, c-Myc, β -Catenin und TNF- α in postkonfluenten Caco-2 Zellen.	68
Abbildung 34:	Effekt von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Smad2-Aktivierung in differenzierten THP-1 Zellen.	69
Abbildung 35:	Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivierung der MAPKinasen p38, ERK1 und ERK2 in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen.	70
Abbildung 36:	Repräsentative Abbildung der Dab2-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen und der p-Dab2-, β -Catenin- und LRP-1-Expression in differenzierten THP-1 Zellen.	71
Abbildung 37:	Effekt von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von PAI-1 in undifferenzierten THP-1 Zellen.	72
Abbildung 38:	Einfluss von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von PAI-1, FN-1, MMP-1, MMP-9, c-Myc, β -Catenin und TNF- α in postkonfluenten Caco-2 Zellen.	73

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Überblick über Interaktionen von Dab2 auf zellulärer Ebene.	11
Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der Polyacrylamidgele für die Elektrophorese.	32
Tabelle 3: Verwendete Primär-Antikörper, Molekulargewicht, Isotyp, eingesetzte Verdünnung und Bezugsfirma.	36
Tabelle 4: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die cDNA-Synthese.	40
Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die PCR.	42
Tabelle 6: Verwendete Primer, Länge des amplifizierten PCR-Produktes, primerspezifische Annealingtemperatur, Zyklenzahl und Sequenzen der verwendeten sense/antisense Primer.	44
Tabelle 7: Überblick über die Regulierung der Gen- und Proteinexpression in differenzierten Caco-2 und THP-1 Zellen im Vergleich zu den undifferenzierten Formen.	58

IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALK	Activine Receptor-Like Kinases
AMHs	Anti Mullerian Hormones
APC	Adenomatous polyposis coli
AP-1	Activating Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATF2	Activating Transcription Factor 2
bHLHZ	Basic Helix-Loop-Helix-Leucine-Zipper
bLF	Bovines Laktoferrin
BLP	Bakterielles Lipoprotein
BMPs	Bone Morphogenic Proteins
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
CKI	Casein Kinase-1
CKIs	Cycline Dependent Kinase Inhibitors
Co-Smad	Common-partner Smad
Dab1;2	Disabled1;2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Dab Homology
Dvl	Dishevelled
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation
ERK1/2	Extracellular regulated kinases 1 und 2
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
FN-1	Fibronektin-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDFs	Growth and Differentiation Factors
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase-3beta
IgG	Immunglobulin G

I κ B	Inhibitory kappaB
ILK	Integrin linked Kinase
I-Smad	Inhibitory Smad
JNK	c-Jun-amino-terminale-Kinase
kDa	kiloDalton
LAP	Latency Associated Protein
LBP	LPS-Binding Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LEF	Lymphoid-enhancing factor
LPS	Lipopolysaccharide
LRP-1;-5	LDL- Receptor-Related Protein-1; -5
LTBP	Latent TGF- β -binding Protein
MACF1	Microtubule-actin cross-linking protein 1
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases
MH	Mad Homology
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
MT-MMPs	Membrane-type MMPs
NF- κ B	Nuclear Factor-kappaB
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	Phosphate-Buffered Saline - Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEN-STREP	Penicillin-Streptomycin
PMA	Phorbol12-Myristate-13-Acetate
PTB	Phosphotyrosine-binding Domain
PID	Phosphotyrosine-interacting Domain
PRD	Prolin-rich Domain
R-Smad	Receptor -regulated Smad
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transcriptase
SAPK	stress activated protein kinase
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation

SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
S/I	Sucrase-Isomaltase
TAK-1	TGF- β Activated Kinase-1
TBS	Tris-Buffered Saline -Tris-gepufferte Salzlösung
TCF	T-cell factor
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TGF- β 1	Transforming Growth Factor-beta 1
TGF- β R I; II	TGF- β Receptor Typ 1; Typ 2
TGIF	TG-Interacting Factor
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
tPA	tissue-type Plasminogen Activator
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

1 EINLEITUNG

Diese Arbeit knüpft an die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an, die bereits bei Chondrozyten, HeLa-, Mef-, Mink- und THP-1 Zellen zytokinartige Wirkungen von Laktoferrin nachweisen konnten. Als pluripotentes Glykoprotein ist Laktoferrin ebenso wie TGF- β 1, ein in der Literatur bereits ausführlich beschriebener Wachstumsfaktor, vielseitig in immunologische und regulatorische Prozesse, unter anderem in die Zellproliferation, -differenzierung und -migration involviert [WARD et al., 2005]. Laktoferrin ist nach Casein als zweithäufigstes Protein der (Kolostral-)Milch [CONNEELY, 2001] maßgeblich an der Reifung der Darmflora beteiligt [LONNERDAL, 2003], kommt aber auch als Hauptbestandteil in den sekundären Granula neutrophiler Granulozyten sowie in geringeren Konzentrationen im Plasma, gastrointestinalen und anderen mukösen Sekreten vor [MASSON et al., 1969; MAACKS et al., 1989]. Aufgrund der antimikrobiellen bzw. anti-inflammatorischen Eigenschaften ist Laktoferrin ein integraler Bestandteil der unspezifischen Abwehr [WARD et al., 2005; LEGRAND et al., 2005].

Die molekularen Mechanismen, über die Laktoferrin Effekte vermittelt, sind noch weitgehend ungeklärt. Vorangegangene Studien konnten jedoch zeigen, dass Laktoferrin nicht nur über den TGF- β -Pathway signalisiert, sondern auch rezeptorvermittelt den MAPKinase-Pathway aktiviert. Da Laktoferrin vielfältig mit Zellen des Immunsystems sowie auch als Bestandteil der Milch mit der intestinalen Mukosa interagiert, wurde in dieser Arbeit neben den humanen monozytären THP-1 Zellen die enterozytäre Caco-2 Zelllinie als Zellmodell gewählt. Die Entwicklung von Monozyten zu reifen ausdifferenzierten Effektorzellen verläuft ebenso wie die spontane Differenzierung von Caco-2 Zellen zu einem enterozytenähnlichen Phänotyp über einen Prozess, der durch verschiedene extrinsische und intrinsische Signale ausgelöst und mit einer Veränderung der Protein- und Genexpressionsmuster verbunden ist [SPORN et al., 1990; HALBLEIB et al., 2007]. Daher wurden zunächst die Grundlevel ausgewählter Mediatoren mittels Western Blot und PCR in verschiedenen Differenzierungsstadien analysiert. Da auch Laktoferrin- und

TGF- β 1-vermittelte Effekte nicht nur vom Zelltyp, sondern auch vom Differenzierungsgrad abhängen [DENNLER et al., 2002; PRÖPPER, 2008], wurde der Einfluss von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 nach ein- und vierstündiger Inkubationszeit auf die Protein- und Genexpression in unterschiedlichen Differenzierungsstadien beider Zelllinien untersucht. Dabei wurde der Schwerpunkt darauf gelegt, Interaktionen zentraler Mediatoren im Crosstalk zwischen TGF- β -, MAPKinase-, Wnt-/ β -Catenin- und anderen Signalwegen zu analysieren.

2 LITERATURÜBERBLICK

2.1 Laktoferrin

Laktoterrin ist strukturell ein Mitglied der Familie der Transferrine [METZ-BOUTIGUE et al., 1984], das erstmals 1960 aus humaner und boviner Milch isoliert wurde [JOHANSON, 1960]. Das 80 kDa große Glykoprotein wird in der apo-Form von Drüsenepithelzellen und neutrophilen Granulozyten synthetisiert und ist in höheren Konzentrationen (1-7 g/l) in der (Kolostral-)Milch sowie in den sekundären Granula Neutrophiler enthalten [BENNETT and KOKOCINSKI, 1978; MASSON et al., 1969]. In geringeren Mengen (0,4-2 mg/l) kommt Laktoferrin auch im Plasma, Speichel, in gastrointestinalen und anderen mukösen Sekreten vor, wobei der Plasmagehalt unter anderem in Antwort auf inflammatorische Prozesse auf bis zu 200 mg/l ansteigen kann [MAACKS et al., 1989]. Die Sekretion von Laktoferrin wird gewebsabhängig durch Hormone und Transkriptionsfaktoren reguliert [TENG et al., 2002].

Abgesehen von der eisenbindenden Funktion, ist Laktoferrin vielseitig in immunologische und regulatorische Prozesse, unter anderem in die Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Migration von Immunzellen wie NK-Zellen oder Monozyten-Makrophagen involviert [WARD et al., 2002; LEGRAND et al., 2008; PUDDU et al., 2009]. Aufgrund der direkten antimikrobiellen Wirkung ist Laktoferrin ein integraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems, interagiert aber auch mit spezifischen Rezeptoren, die als Schlüsseleffektoren durch die Endozytose und die Signalvermittlung über den Mitogen-activated protein kinase- (MAPK-) sowie den NF- κ B-Pathway anti-inflammatorische und immunmodulatorische Effekte von Laktoferrin vermitteln [SUZUKI et al., 2005; BIRGENS et al., 1983; WARD et al., 2005; OH et al., 2004]. Laktoferrin bindet als Ligand unter anderem an LRP-1 (s. Kapitel 1.6.) [HUETTINGER et al., 1992; WILLNOW et al., 1992], der nicht nur die Aufnahme von Laktoferrin aus dem Plasma sowie die Translokation über die Blut-Hirn-Schranke [MEILINGER et al., 1995; FILLEBEEN et al., 1998], sondern auch an der Oberfläche verschiedener Immunzellen Laktoferrin-induzierte Signale vermittelt [LEGRAND et al., 2006].

Die biologischen Wirkungen von Laktoferrin sind vielfach ambivalent. Laktoferrin induziert einerseits die Aktivierung von Makrophagen sowie die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α [SORIMACHI et al., 1997; MACHNICKI et al., 1993]. Andererseits unterdrückt Laktoferrin in THP-1 Monozyten durch Hemmung der NF- κ B-Aktivierung auf transkriptioneller Ebene deren Freisetzung [HAVERSEN et al., 2002].

In vitro-Studien konnten im Caco-2 Zellmodell konzentrationsabhängige Effekte von Laktoferrin auf die Zellproliferation und –differenzierung nachweisen. Während hohe Konzentrationen (100 μ g/ml) wachstumsfördernd wirkten, hemmten niedrige Dosen (1 μ g/ml) das Wachstum und induzierten bevorzugt die Zelldifferenzierung. In diesem Zusammenhang konnten auch vergleichbare Effekte von bovinem Laktoferrin wie von humanen Isoformen auf intestinale Enterozyten beobachtet werden [BUCCIGROSSI et al., 2007]. Da Laktoferrin die postnatale Entwicklung der intestinalen Mikroflora positiv beeinflusst [LONNERDAL, 2003], wird der Zusatz von bovinem Laktoferrin auch als funktioneller Nährstoff zu Formulanahrung diskutiert [BUCCIGROSSI et al., 2007].

2.2 Transforming Growth Factor beta1 (TGF- β 1)

Der Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) zählt wie Bone Morphogenic Proteins (BMPs), Activine, Growth and Differentiation Factors (GDFs) und Anti-Müllerian Hormones (AMHs) zu der TGF- β -Superfamilie [PIEK et al., 1999; MASSAGUE, 1990]. Von den drei bei Säugern identifizierten Isoformen kommt TGF- β 1 als häufigste im humanen Plasma, sowie ubiquitär vor [SHI und MASSAGUE, 2003; WAKEFIELD et al., 1995].

Als pleiotropes Zytokin ist TGF- β 1 an der Regulation einer Reihe zellulärer Prozesse wie der Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose beteiligt, indem es unter anderem durch die Reorganisation des Zytoskeletts und die Modulation des Zell-Zell-Verbandes morphologische Veränderungen begünstigt [MASSAGUE, 2000; MOUSTAKAS et al., 2002].

Die physiologischen Effekte von TGF- β 1 können in Abhängigkeit des jeweiligen Zelltyps, Entwicklungs- und Differenzierungsgrades divergent sein [SPORN, 1999].

TGF- β 1 gilt einerseits aufgrund der anti-proliferativen Wirkung und der Fähigkeit, die Apoptose zu induzieren als Tumorsuppressor. Die TGF- β 1-induzierte Apoptose spielt nicht nur für den koordinierten Zellumsatz des gastrointestinalen Epithels, sondern auch für die Regulation der Immunantwort eine Rolle [GOLD et al., 1999; LI et al., 2006a]. Andererseits kann TGF- β 1 insbesondere im fortgeschrittenen Stadium von Karzinomzellen bei Verlust der autokrinen TGF- β -Aktivität bzw. der Responsivität gegenüber exogenem TGF- β 1 die Tumorprogression begünstigen [MARKOWITZ und ROBERTS, 1996; DERYNCK et al., 2001; JAKOWLEW, 2006]. Ebenso kann auch eine verstärkte TGF- β 1-Sekretion von Karzinomzellen durch Immunsuppression die Tumorgenese fördern [DE VISSER und KAST, 1999; PASCHE, 2001]. Die Tumordinvasion und -metastasierung ist häufig von einer EMT (Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation) begleitet, die durch Veränderungen der Zellmorphologie

charakterisiert ist und durch extrazelluläre Signale wie TGF- β 1 induziert wird [OFT et al., 1998; AKHURST und BALMAIN, 1999; XU et al., 2009].

Als Schlüsselregulator der Immunantwort wird TGF- β 1 von allen Zellen des Immunsystems sezerniert, kann jedoch in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades als Stimulator von Monozyten bzw. Inhibitor aktivierter Makrophagen fungieren [ASHCROFT, 1999; LETTERIO und ROBERTS, 1998]. TGF- β 1 wirkt einerseits auf Monozyten chemotaktisch [WAHL et al., 1987] und begünstigt durch Stimulierung von MMPs die Migration sowie durch Induktion von Adhäsionsmolekülen und Fibronectinrezeptoren an der Zelloberfläche deren Adhärenz [WAHL et al., 1993; BAUVOIS et al., 1992]. Andererseits wird die Expression makrophagenspezifischer Oberflächenrezeptoren wie CD-36, die maßgeblich an der Phagozytose von Pathogenen sowie von apoptotischen Zellen beteiligt sind, ebenso wie die Expression LPS-induzierter inflammatorischer Zytokine wie TNF- α durch TGF- β 1 gehemmt [BOTTALICO et al., 1991; MCDONALD et al., 1999].

TGF- β 1 wird in latenter Form sezerniert und kann erst nach Abspaltung des Latent-TGF- β -binding protein (LTBP) sowie des Latency associated protein (LAP) durch Bindung an entsprechende Oberflächenrezeptoren (TGF- β -Rezeptoren) die biologische Aktivität entfalten [MASSAGUE, 1990]. In vitro kann die Aktivierung durch Hitzeeinwirkung, Absenkung des pH-Wertes oder enzymatische Proteolyse erfolgen [KINGSLEY, 1994].

2.2.1 TGF- β -Pathway

TGF- β 1 bindet wie auch andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie an der Zelloberfläche an Typ I und Typ II Rezeptoren, die durch Aktivierung von Smadproteinen intrazelluläre Signale vermitteln [DERNYCK und FENG, 1997; JAVELAUD und MAUVIEL, 2004]. Im kanonischen TGF- β -Pathway sind die beiden transmembranen Serin/Threonin Kinasen, TGF- β RI ALK-5 (activin receptor like kinase-5) und TGF- β RII, für die Signaltransduktion unerlässlich [MASSAGUE, 2000; MASSAGUE und WOTTON, 2000].

Typ III Rezeptoren wie Endoglin und β -Glycan können als Co-Rezeptoren den Zugang von TGF- β 1 zu den beiden signalisierenden Rezeptoren regulatorisch beeinflussen, ohne jedoch selbst Signale zu vermitteln [TEN DIJKE et al., 1996]. Das 180 kDa große, homodimere Glykoprotein Endoglin (CD105) fungiert als Inhibitor der ALK-5/Smad2/3-abhängigen Signalvermittlung [LETAMENDIA et al., 1998; BLANCO et al., 2005], während β -Glycan die Bindung aller TGF- β -Isoformen an die signalisierenden Rezeptoren fördert [LASTRES et al., 1996; LETAMENDIA et al., 1998].

Als intrazelluläre Mediatoren spielen Rezeptor-regulierte Smadproteine (R-Smads) für die Signaltransduktion eine wesentliche Rolle. Smad2 und Smad3 kommen als spezifische Substrate im kanonischen TGF- β -, und Activin-Pathway, Smad1, 5 und 8 im BMP-Pathway vor. R-Smads bestehen aus zwei konservierten MH-Domänen (Mad homology), die eine globuläre Struktur bilden und über eine prolinreiche Linker-Region miteinander verbunden sind [MIYAZONO et al., 2000; SHI und MASSAGUE, 2003]. Während die N-terminale MH1-Domäne DNA-Bindungs-Aktivität besitzt, können über die MH2-Domäne am C-terminalen Ende Proteine gebunden sowie Transkriptionsfaktoren aktiviert oder gehemmt werden [MASSAGUE und GOMIS, 2006].

Die Ligandenstimulierung initiiert die Phosphorylierung und Aktivierung des Typ I Rezeptors durch den Typ II Rezeptor unter Ausbildung eines heterotetrameren Komplexes. In weiterer Folge kann der aktivierte Typ-I-Kinase-Rezeptor durch Interaktion mit dem Adaptermolekül SARA (Smad anchor for receptor activation) den Zugang von Smad2 und Smad3 erleichtern [XU et al., 2000] und nachfolgend durch spezifische Phosphorylierung aktivieren. Die aktivierten R-Smads translozieren nach Ausbildung oligomerer Komplexe mit Co-Smad 4 in den Zellkern. Dort können diese Smadkomplexe direkt oder indirekt über DNA-bindende Proteine mit der DNA interagieren und in Kooperation mit Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren die Transkription spezifischer Gene regulieren [DERNYCK und FENG, 1997; SHI und MASSAGUE, 2003; JAVELAUD und MAUVIEL, 2004].

Inhibitorische Smadproteine, I-Smad6 und I-Smad7, kontrollieren bzw. beenden die Smad-abhängige Signaltransduktion, indem diese die Phosphorylierung und/oder die nukleäre Translokation von R-Smads verhindern bzw. die ubiquitin-abhängige, proteasomale Degradation des Rezeptorkomplexes induzieren [KAVSAK et al., 2000; EBISAWA et al., 2001]. Die inaktivierten R-Smads werden nach Verlassen des Zellkerns im Zytoplasma an das membranassoziierte Protein SARA gebunden gespeichert, wodurch ein unkontrollierter Eintritt inaktiver R-Smads in den Zellkern verhindert wird [SHI und MASSAGUE, 2003].

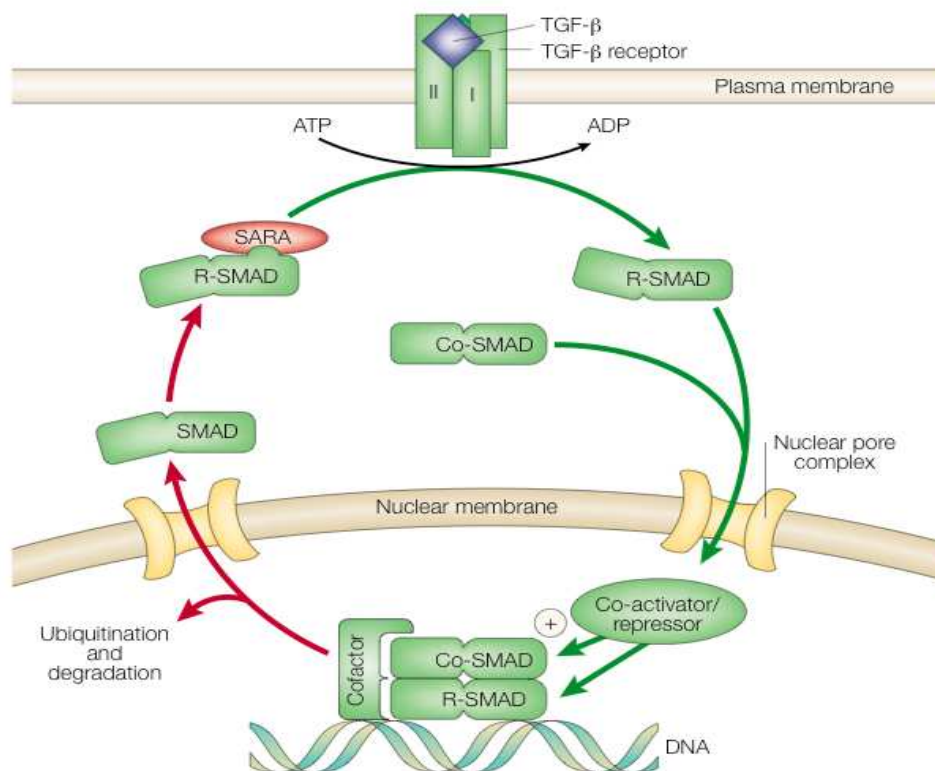


Abbildung 1: Grafische Darstellung des kanonischen TGF- β -Pathway [MASSAGUE, 2000].

Typische Gene, die über den TGF- β -Pathway reguliert werden, sind unter anderem PAI-1, FN-1 oder c-Myc.

PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) ist ein klassischer downstream-Effektor, der in Antwort auf TGF- β 1 verstärkt exprimiert wird [LAIHO et al., 1986; THALACKER und NILSEN-HAMILTON, 1987]. Als Bestandteil des Plasminogenaktivator-Systems, das zudem aus tPA (tissue-type PA), uPA

(urokinase-type PA), Plasminogen und Plasmin besteht, ist PAI-1 maßgeblich an der Regulation der Zelladhäsion, -migration und -invasion sowie der Homöostase der Extrazellulärmatrix beteiligt [NICHOLL et al., 2006]. PAI-1 kann als physiologischer Inhibitor von tPA und uPA die proteolytische Aktivität und nachfolgende Degradation der Extrazellulärmatrix hemmen [BOSMA et al., 1988] und ist im Zusammenspiel mit tPA und LRP wesentlich in der Migration aktivierter Makrophagen involviert [CAO et al., 2006].

Darüber hinaus kann TGF- β 1 auch über die Expressionskontrolle von Zelladhäsionsproteinen und extrazellulären Matrixproteinen wie zum Beispiel Fibronectin den Auf- und Umbau der Extrazellulärmatrix beeinflussen [IGNOTZ und MASSAGUE, 1986].

Die Vermittlung der anti-proliferativen Wirkung von TGF- β 1 erfolgt über die Regulation von Zellzyklusregulatoren wie c-Myc sowie der Zyklin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CKI) p15, p21 und p27 [HANNON und BEACH, 1994; MASSAGUE et al., 2000]. Das Proto-onkogen c-Myc ist als Transkriptionsfaktor der bHLHZ (basic helix-loop-helix-leucine-zipper)-Familie ein ubiquitärer Promotor von Zellwachstum und -proliferation [FACCINI und PENN, 1998]. In Abhängigkeit assoziierter Faktoren kann c-Myc als transkriptioneller Aktivator oder Repressor fungieren [DANG, 1999]. Die TGF- β 1-induzierte Reduktion der c-Myc-Expression führt über die Aktivierung der p15- und p21-Pathways dabei zu einer Stilllegung der G1-Phase des Zellzyklus [WARNER et al., 1999].

2.3 Disabled- Dab1, Dab2

Das Drosophila Protein Disabled (Dab) wurde ursprünglich als Genprodukt mit einer Schlüsselrolle in der neuronalen Entwicklung identifiziert [GERTLER et al, 1989].

Dab1, ein Mitglied der Disabled-Gen-Familie, wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert [HOWELL et al., 1997] und spielt wie Drosophila Dab vor allem in der neuronalen Entwicklung, aber auch als intrazellulärer Bestandteil des Reelin-Signalweges in der Zellpositionierung, -migration und -adhäsion eine Rolle [GOTTHARDT et al., 2000; YUN et al., 2003, HONDA und NAKAJIMA, 2006].

Als Adapterprotein interagiert Dab1 N-terminal über die PTB-ähnliche DH-Domäne (Dab homology) unter anderem mit Mitgliedern der LDL-Rezeptor Familie [HOWELL et al., 1999; YUN et al., 2003].

Dab2 ist (mit einer zu 66% identen PTB-Domäne) ein strukturelles Homolog von Dab1[YUN et al., 2003], das nach seiner erstmaligen Identifizierung auch als DOC-2 (differentially expressed in ovarian carcinoma) [MOK et al., 1994] bzw. nach der CSF-1 induzierten Phosphorylierung als p-96 [Xu et al., 1995] bezeichnet wird. Die Struktur dieses Phosphoproteins lässt auf eine Rolle als Adaptermolekül schließen [PAWSON und SCOTT, 1997] und kann in drei funktionelle Domänen unterteilt werden: eine N-terminale phosphotyrosine-binding (PTB) bzw. –interacting (PID) domain, eine C-terminale, prolinreiche (PRD) Domäne sowie eine dazwischenliegende Linker-Region [Xu et al., 1995]. Dab2 wird durch die Protein Kinase C (PKC) ausschließlich an Serinresten [XU et al., 1995, TSENG et al., 1999] sowie durch die cyclin-abhängige Kinase cdc2 an mehreren Stellen, insbesondere während der Mitosephase, phosphoryliert [HE et al., 2003].

Als Adaptermolekül ist Dab2 auf zellulärer Ebene vielseitig in die Regulation rezeptorvermittelter Signalwege sowie in den Prozess von Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung involviert (s. Tabelle 1). Die molekularen Mechanismen, über die Dab2 interagiert, sind dabei vielfach noch ungeklärt.

Interaktionen	Referenzen
Dab2 wird in verschiedenen Tumorarten inaktiviert bzw. down-reguliert und gilt als potentiell Tumor-suppressorgen.	MOK et al., 1994; FULOP et al., 1998; FAZILI et al., 1999
Dab2 übt auf verschiedene Zelltypen antiproliferative Effekte aus.	FULOP et al., 1998; MOK et al., 1998; TSENG et al., 1999; SHENG et al., 2000; HE et al., 2001; SMITH et al., 2001, WANG et al., 2001
Dab2 verbindet als positiver Mediator im TGF- β -Pathway den TGF- β -Rezeptor-Komplex mit Smad2/3.	HOCEVAR et al., 2001
Dab2 fungiert als Bindeglied im Crosstalk zwischen Smad- und JNK-Signalweg und vermittelt die TGF- β 1-stimulierte JNK- Aktivierung, FN-1-Induktion und Zellmigration.	ENGEL et al., 1999 HOCEVAR et al., 2005
Dab2 ist ein Negativregulator des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Pathways, der durch direkte Interaktion mit Axin und Dvl3 die Degradation von β -Catenin forciert.	HOCEVAR et al., 2003; JIANG et al., 2008
Dab2 ist ein potentieller Repressor des RAS-vermittelten MAPKinase-Pathway, der durch kompetitive, C-terminale Bindung von Grb2 die Aktivierung von ERK sowie die AP-1-vermittelte Genexpression unterdrückt.	ZHOU und HSIEH, 2001
Up-Regulation von Dab2 fördert die Adhärenz von Makrophagen und stimuliert als adhesion-responsive Phosphoprotein die Reorganisation des Zytoskeletts.	ROSENBAUER et al., 2002
TGF- β 1 induziert die Dab2-Expression auf RNA- und Proteinlevel.	PRUNIER und HOWE, 2005
Aufgrund der strukturellen Homologie zu Dab1 könnte auch Dab2 durch Interaktion mit coated Vesikel über AP-2, Clathrin oder Myosin VI an der Endozytose beteiligt sein und ähnliche Membranbindungen vermitteln.	MORRIS und COOPER, 2001; OLEINIKOV et al., 2000; INOUE et al., 2002
Dab2 ist vielfältig in die Regulation der Zellformation, -positionierung, und -differenzierung involviert.	PRUNIER und HOWE, 2005; MORRIS et al., 2002; YANG et al., 2002

Tabelle 1: Überblick über Interaktionen von Dab2 auf zellulärer Ebene.

2.4 Wnt-/β-Catenin-Pathway

Der Wnt-/β-Catenin-Pathway hat direkten Einfluss auf die Stabilität und Organisation des Zytoskeletts und kann durch Modulierung der β-Catenin-Level die Expression spezifischer Gene regulieren und damit auch mit verschiedenen Signalwegen, wie zum Beispiel mit dem TGF-β-Pathway, interagieren [SALINAS, 2007].

β-Catenin erfüllt als membran-assoziiertes Plasmaprotein in der zellulären Signalvermittlung eine duale Funktion. An das zytoplasmatische Ende von E-Cadherin gebunden, ist β-Catenin einerseits als Adapterprotein für die Stabilisierung des Zell-Zell-Kontaktes von Bedeutung und reguliert andererseits in freier, zytoplasmatischer Form als zentrales Signalmolekül des Wnt-Pathway die TCF-/LEF-vermittelte Transkription verschiedener Gene [CLEVERS, 2006].

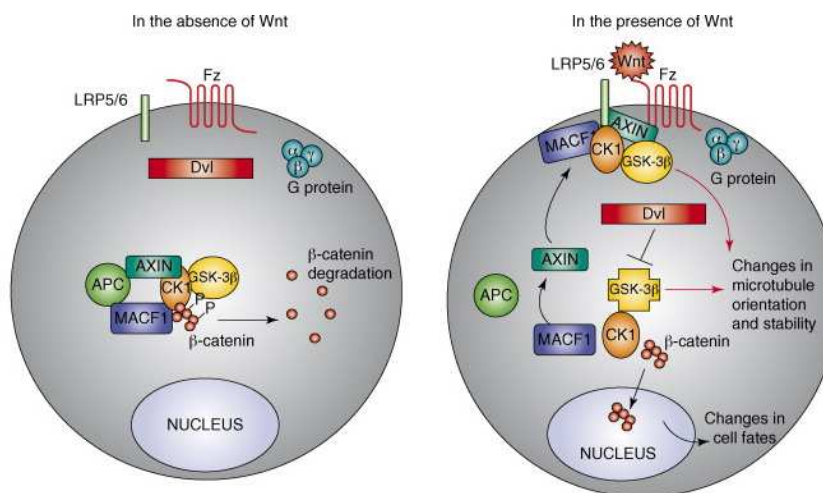


Abbildung 2: Grafische Darstellung des Wnt-/β-Catenin-Pathway [SALINAS, 2007].

In Abwesenheit von Wnt-Proteinen wird zytoplasmatisches β-Catenin N-terminal über einen Abbaukomplex, gebildet aus der Serin/Threonin Kinase Gsk-3β, der Casein Kinase-1 (CK1), Axin, APC (dem Produkt des APC-Tumorsuppressorgens) und MACF1 (microtubule-actin crosslinking factor), phosphoryliert und damit für die anschließende ubiquitin-abhängige proteasomale Degradation markiert [SALINAS, 2007].

In Anwesenheit von Wnt wird durch den G-Protein gekoppelten Rezeptor Frizzled in Assoziation mit dem Co-Rezeptor LRP5/6 über die Aktivierung von

Dishevelledproteinen (Dvl) der Zerfall des Abbaukomplexes induziert. Dadurch werden die Phosphorylierung sowie der nachfolgende Abbau von β -Catenin gehemmt [GORDON und NUSSE, 2006]. Die Ausbildung des Abbaukomplexes kann zudem verhindert werden, indem Axin zur Zellmembran rekrutiert und durch Interaktion mit LRP5/6 blockiert wird [DAVIDSON et al., 2005; ZENG et al., 2005]. In der Folge kann β -Catenin im Zytoplasma akkumulieren und nach Translokation in den Zellkern die Transkription TCF/LEF-abhängiger Gene stimulieren [SALINAS, 2007].

Dazu zählen unter anderem Matrixproteine wie FN-1, Proteasen wie MMP-2 und MMP-9 oder Zellzyklusregulatoren wie c-Myc [GRADL et al. 1999; WU et al., 2007; HE et al., 1998].

Die Inaktivierung von Gsk-3 β ist Voraussetzung für die Stabilisierung von zytoplasmatischem β -Catenin. Diese kann durch Wachstumsfaktoren ebenso wie durch Integrine über die Aktivierung der ILK (Integrin-linked Kinase) vermittelt werden [DEDHAR et al., 1999; TAN et al., 2001]. Während in mesenchymalen Zellen zahlreiche kooperative Effekte von β -Catenin und TGF- β 1 beobachtet werden können [LI et al., 2006b; DONG et al., 2005], gilt β -Catenin in epithelialen Zellen durch die Interaktion mit R-Smads als Negativregulator TGF- β 1-induzierter Signale [ZHANG et al., 2007].

Abgesehen vom Wnt- β -Catenin-Pathway kann die Smad-abhängige Signaltransduktion auch durch Interaktion mit anderen Signalwegen über verschiedene Mechanismen moduliert werden, beispielsweise über den MAPK-Pathway [MASSAGUE und CHEN, 2000].

2.5 Mitogen activated protein kinase- Pathway

Ein weiterer Signalweg, der in Antwort auf TGF- β 1 und Laktotferrin aktiviert werden kann, ist der MAPK-Pathway [HARTSOUGH und MULDER, 1995].

Die extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) zählt neben, p38 (α , β , γ , δ) und c-Jun-amino-terminale kinase (JNK) zu den drei wesentlichen Subfamilien der Mitogen activated protein kinases (MAPKs), die unter anderem durch TGF- β 1 Smad-abhängig und –unabhängig aktiviert werden [CHANG und KARIN, 2001; DERYNCK und ZHANG, 2003]. Die Raf-MEK-ERK-Kaskade wird hauptsächlich durch mitogene Faktoren induziert, die stressaktivierten Proteinkinasen (SAPK) p38 und JNK vor allem durch stressinduzierende Stimuli wie Hitze, UV-Strahlung oder pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α [ROBINSON und COBB, 1997]. In Antwort auf extrazelluläre Stimuli werden ERK, p38 bzw. JNK über die dreistufige kanonische MAPK-Kaskade aktiviert und können nach der Translokation in den Zellkern durch Phosphorylierung nachgeschalteter Effektoren die Genexpression regulieren [JOHNSON und LAPADAT, 2002].

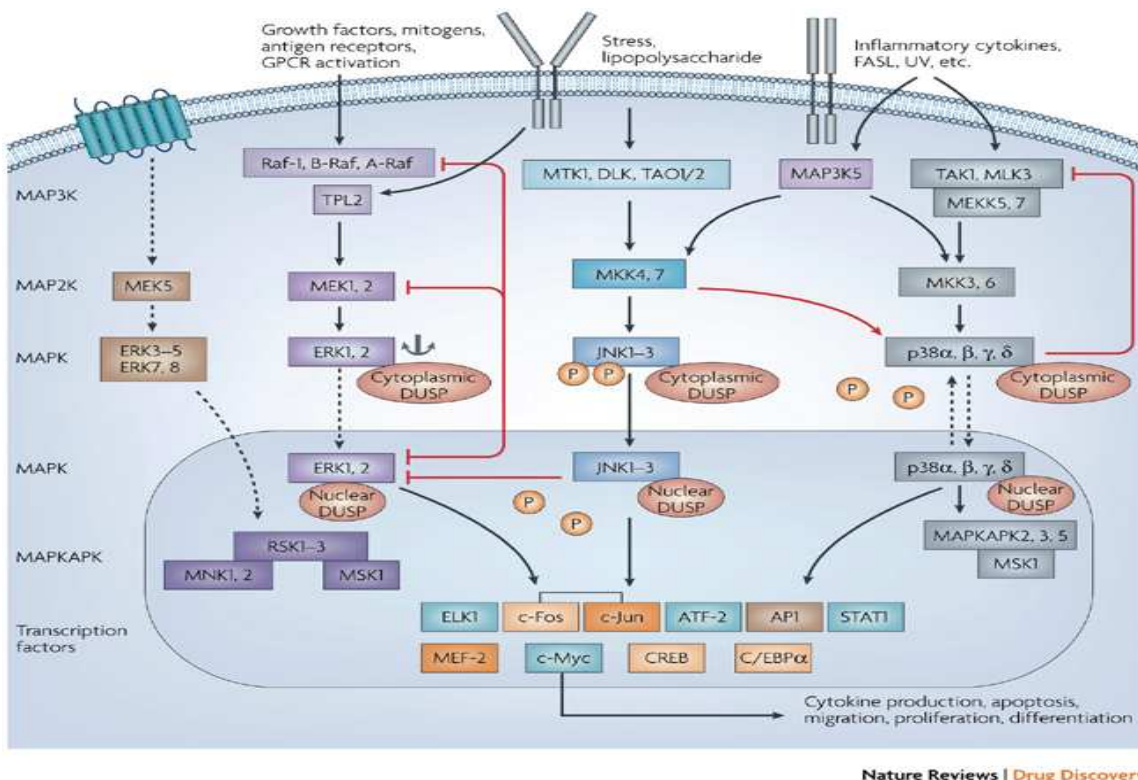
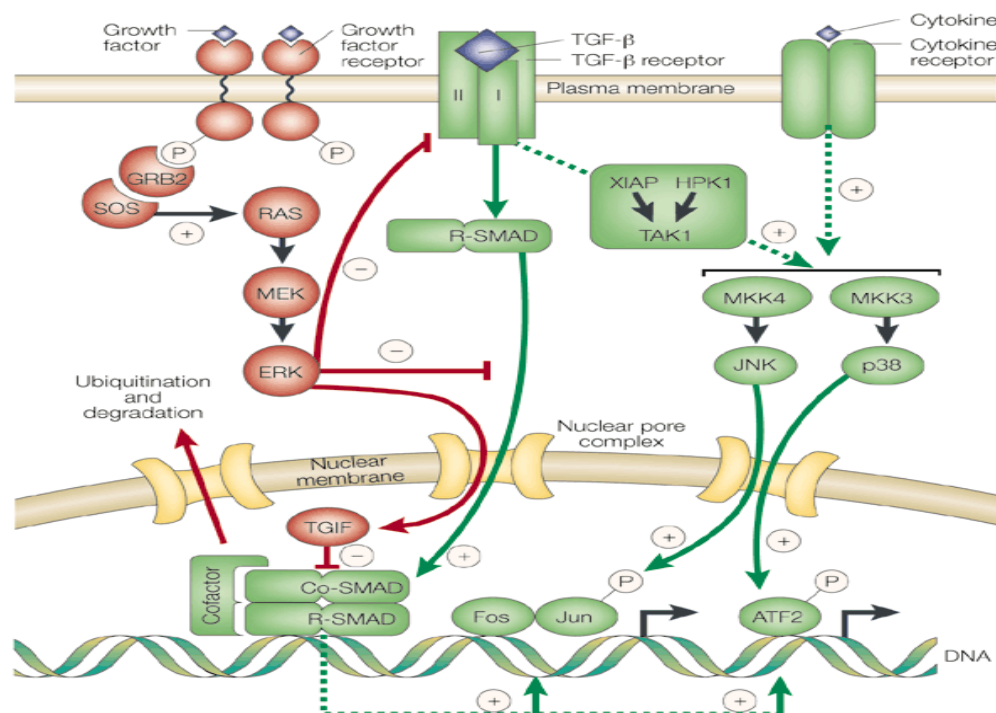


Abbildung 3: Grafische Darstellung des MAPK-Pathway. [JEFFREY et al., 2007]

In Abhängigkeit des Zelltyps sind die einzelnen MAPKs in den dynamischen Prozess der Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose involviert [JOHNSON und LAPADAT, 2002]. Während die Aktivierung des JNK- und p38-Pathways vor allem bei der TGF- β -induzierten EMT, der Apoptose [YU et al., 2002; LIAO, 2001] sowie bei der Migration epithelialer Zellen eine Rolle spielt, sind ERK1 und ERK2 maßgeblich an der Zellproliferation beteiligt [SHARMA et al., 2003]. Zudem gilt p38 als Regulator der Immunantwort, der nicht nur die PMA-induzierte Freisetzung inflammatorischer Zytokine sowie die Aktivierung von NF- κ B in humanen THP-1 Zellen modulieren, sondern auch direkt und indirekt die Expression und Aktivität von MMPs beeinflussen kann [MUNSHI et al., 2004; NGUYEN et al., 2006].

Abgesehen von Interaktionen zwischen den einzelnen MAPKs, besteht auch ein Crosstalk mit anderen Signalwegen, wie zum Beispiel dem TGF- β -Pathway, die sich über mehrere Mechanismen wechselseitig beeinflussen [JAVELAUD und MAUVIEL, 2005].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abbildung 4: Crosstalk zwischen TGF- β - und MAPK-Pathway [MASSAGUÉ, 2000].

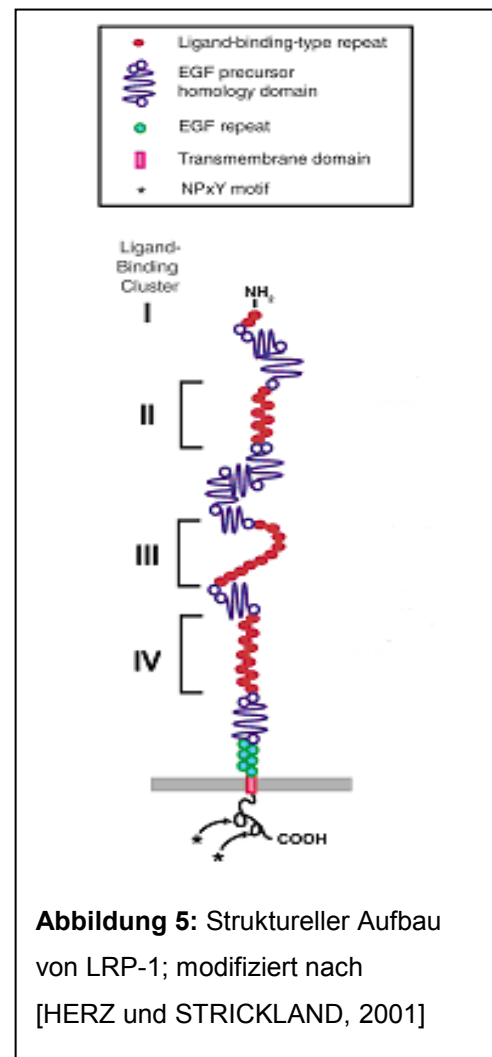
Über den Ras-MEK-ERK-Pathway können beispielsweise TGF- β -Rezeptorlevel moduliert, sowie die Aktivierung und nukleäre Translokation von R-Smads direkt durch Phosphorylierung in der Linker-Region reguliert werden [KRETZSCHMAR et al., 1997]. Indirekt kann auch eine Modulation über die Expressionskontrolle von Smad-Co-Repressoren wie TGIF (TG-interacting factor) sowie von I-Smads erfolgen [BRODIN et al., 2000]. Ebenso können p38 und JNK durch posttranslationelle Modifikation [KAMARAJU und ROBERTS, 2005] sowie über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Jun und ATF2 (Activating Transcription Factor 2) die transkriptionelle Aktivität von Smad2 und Smad3 beeinflussen [PESSAH et al., 2001; SANO et al., 1999].

Der MKK4/JNK- bzw. der MKK3/p38-Pathway kann auch Smad-unabhängig durch TGF- β 1 aktiviert werden [CHANG und KARIN, 2001]. Dabei werden TAK-1 (TGF- β Activated Kinase-1) [YAMAGUCHI et al., 1995; TAKATSU et al., 2000] und Rho-Proteine [VOJTEK und COOPER, 1995; ENGEL et al., 1999] als potentielle Schnittstellen zwischen TGF- β -Rezeptoren und den MAPK-Kaskaden diskutiert. JNK kann in weiterer Folge spezifische Transkriptionsfaktoren wie c-Jun phosphorylieren, welches mit c-Fos heterodimerisiert als Komponente des AP-1 (Activating Protein-1) Transkriptionskomplexes über die Interaktion mit entsprechenden Bindungsstellen die Expression spezifischer Gene reguliert [ANGEL et al, 1988; DÉRIJARD et al, 1994]. Ein klassisches Zielgen, das in Antwort auf TGF- β 1 über die Aktivierung von JNK induziert wird, ist zum Beispiel Fibronektin. [HOCEVAR et al., 1999] Zudem kann auch die TGF- β 1-induzierte Expression von PAI-1 AP-1-abhängig [WOODWARD et al., 2006], sowie in Abhängigkeit der Zelladhärenz über den MEK/ERK-Pathway stimuliert werden [KUTZ et al., 2001; CHANG et al., 2003].

2.6 LRP-1 - Low-density lipoprotein receptor-related protein-1

LRP-1 ist ein 600 kDa großer, endozytotischer Rezeptor, der als Mitglied der Familie der LDL-Rezeptoren an der Oberfläche zahlreicher Zellen, unter anderem auch von Makrophagen lokalisiert ist [KRIEGER und HERZ, 1994].

Das multifunktionelle Glykoprotein besteht aus einer extrazellulären, schweren α -Kette (515 kDa), einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären, leichten β -Kette (85 kDa) [HERZ und STRICKLAND, 2001]. Über die extrazellulären Liganden-Bindungs-Einheiten, Cluster I-IV, wird eine Vielzahl strukturell und funktionell unterschiedlicher Liganden mit hoher Affinität gebunden und endozytiert. Die meisten der bekannten Liganden wie MMP-9, PAI-1, tPA, uPA oder Laktoferrin interagieren hauptsächlich mit Cluster II und IV, während RAP und apo-E bislang als einzige Bindungspartner im Bereich der Cluster I und III identifiziert wurden [NEELS et al., 1999; HERZ und STRICKLAND, 2001]. Aufgrund der Fähigkeit multiple Liganden



zu binden, ist LRP-1 an diversen physiologischen und pathologischen Prozessen wie dem Lipidstoffwechsel, der Aktivierung lysosomaler Enzyme oder der Regulation des zellulären Eintritts verschiedener Viren und Toxine beteiligt. Zudem können über zwei Bindungsstellen (NPxY-Motive) im Bereich der zytoplasmatischen Domäne Adapterproteine wie Dab1 oder Shc gebunden werden, wodurch LRP-1 neben der Funktion als Scavenger Rezeptor auch in

Signaltransduktionswege wie dem MAPKinase-Pathway involviert ist [HERZ und STRICKLAND, 2001].

In Osteoblasten fungiert LRP-1 als mitogener Rezeptor für Laktoferrin, der durch Signalisierung zu den MAPKinasen ERK1/2 das Laktoferrin-induzierte Osteoblastenwachstum stimuliert [GREY et al., 2004].

Darüber hinaus reguliert LRP-1 über den ERK-MAPKinase-Signalweg die Expression von Matrix Metalloproteinasen wie MMP-9 oder MMP-2 auf transkriptioneller Ebene und ist über mehrere Mechanismen an der Modulation der Zellmigration und -invasion beteiligt [WEBB et al., 2000; NASSAR et al., 2002; DEDIEU et al., 2008]. Als downstream Effektor von LRP-1 kann ERK in weiterer Folge durch die Phosphorylierung der Myosin Light chain Kinase (MLCK) eine erhöhte Kontraktilität des Zytoskeletts vermitteln, wodurch die Zellmigration gefördert wird. [TAKAYAMA et al., 2003].

Die LRP-abhängige Steuerung der Zellmigration und -invasion erfolgt unter anderem auch über die Regulation von Matrix Metalloproteinasen wie MMP-1, MMP-9 oder MMP-2, die direkt oder indirekt mit LRP-1 interagieren [WEBB et al., 2000; EMONARD et al., 2004, SALMELA et al., 2004]. Nach WEBB et al. kann die Aktivierung von ERK sowie von MMPs indirekt über die LRP-1-abhängige Steuerung des uPA/uPAR-Systems erfolgen. Dieses kontrolliert unter anderem die Grundlevel von ERK und fungiert als Aktivator verschiedener Matrix Metalloproteinasen [WEBB et al., 2000; CHAKRABORTI et al., 2003]. Während LRP-1 die MMP-9-Expression über tPA und den ERK-MAPKinase-Signalweg reguliert [HU et al., 2006], wird die Menge und Aktivität von MMP-2 durch direkte Interaktion von pro-MMP-2, TIMP2 und dem pro-MMP-2-TIMP2-Komplex mit LRP-1 kontrolliert. [YANG et al., 2001; EMONARD et al., 2004]

Im Zuge der Differenzierung monozytärer THP-1 Zellen wird LRP-1 verstärkt exprimiert und gilt als Differenzierungsmarker für Makrophagen [WATANABE et al., 1994].

2.7 Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie zinkhaltiger Endopeptidasen, die durch ihre Fähigkeit Bestandteile der EZM abzubauen und damit die Integrität und Zusammensetzung der EZM zu modulieren, maßgeblich an der Regulation von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind [NAGASE und WOESSNER, 1999; MASSOVA et al., 1998].

Strukturell unterscheiden sich die Gruppen dieser proteolytischen Enzyme je nach Art und Anzahl der vorhandenen Domänen. Allen gemeinsam ist ein N-terminales Propeptid sowie eine katalytische Domäne, die über eine Zinkbindungsstelle verfügt. Abgesehen von den Matrilysinen besitzen MMPs auch eine Hämoexin-ähnliche Domäne am C-terminalen Ende. Nach der Struktur, ihrer Lokalisierung und Substratspezifität können MMPs in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine sowie membranständige MT-MMPs (membrane type MMPs) unterteilt werden [NAGASE und WOESSNER, 1999].

Eine Regulation der MMPs auf mehreren Ebenen und in engen Grenzen ist für den Umsatz und die Restrukturierung der EZM Voraussetzung, um eine abnorme Entwicklung sowie pathologische Zustände durch unkontrollierte Proteolyse zu verhindern [STERNLICHT und WERB, 2001].

Da MMPs als latente Pro-Form sezerniert werden, ist die Aktivierung der Zymogene neben der (post-)transkriptionellen Regulation der Genexpression und der extrazellulären Steuerung durch TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) ein kritischer Kontrollpunkt [NAGASE und WOESSNER, 1999]. Zu den physiologischen Aktivatoren von MMPs zählen unter anderem LRP-1, Plasmin, uPA, tPA oder MT-MMPs [CHAKRABORTI et al., 2003].

Auf transkriptioneller Ebene werden MMPs sowie TIMPs über Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen wie zum Beispiel TGF- β 1 oder TNF- α reguliert [NAGASE und WOESSNER, 1999; YAN und BOYD, 2007]. Der zelluläre Phorbolrezeptor PCK spielt dabei als second messenger in der MMP-Regulation ebenso eine Rolle wie der mitogenaktivierte ERK1/2 bzw. 5/6-Pathway als Aktivator von MMP-1 [CHAKRABORTI et al., 2003].

Die Expression von MMPs kann auch durch Interaktionen mit AP-1 Elementen an konservierten Stellen im Promotorbereich erfolgen, die als Schnittstelle zwischen MMPs und verschiedenen Mediatoren zytokin-vermittelter Signalwege fungieren [KARIN et al., 1997]. Die Expression von MMP-1 wird beispielsweise in Fibroblasten oder T-Lymphozyten AP-1-abhängig über stressaktivierte MAPK Signalmoleküle durch Laktoferrin induziert. [OH et al., 2001].

Posttranskriptionell kann die Genexpression über die Stabilität der m-RNA im Zytoplasma gesteuert werden [YAN und BOYD, 2007]. Zudem kann auch eine Aktivierung über den Cystein-switch Mechanismus erfolgen, wobei die Pro-Domäne durch Konformationsänderung oder Proteolyse entfernt wird [VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN, 1990].

2.7.1 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α)

Als inflammatorisches Zytokin wird der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) primär von aktivierten Monozyten und Makrophagen in Antwort auf Lipopolysaccharide (LPS) und bakterielle Lipoproteine (BLP) sezerniert [TRACEY und CERAMI, 1994]. In humanen THP-1 Zellen kann endogenes TNF- α über den NF- κ B-Pathway unter anderem auch die Expression von MMP-9 induzieren [ZHOU et al., 2003], welches wesentlich in die Zellproliferation, -invasion und -metastasierung involviert ist [LYNCH und MATRISIAN, 2002].

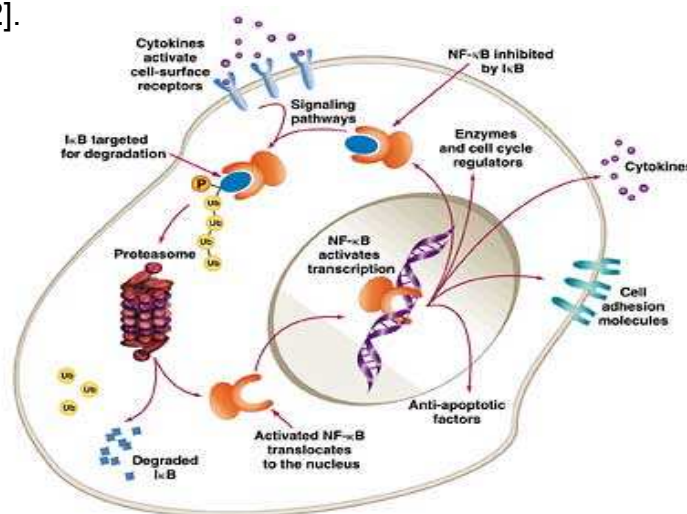


Abbildung 6: Grafische Darstellung der NF- κ B-Aktivierung. [MONTAGUT et al., 2005]

Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie können in Antwort auf die rezeptor-abhängige Aktivierung durch Zytokine wie TNF- α nach Phosphorylierung und anschließender ubiquitin-abhängiger Degradierung der I κ B-Untereinheit in den Zellkern translozieren. Dort können diese durch Bindung an regulatorische Elemente der DNA spezifische Gene, wie zum Beispiel MMP-9, stimulieren [KARIN und GRETEN, 2005].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Laminar Flow Hood Biosafe2	Ehret
Brutschrank Queue	Sanova
Mikroskop	Zeiss Axiovert 135
Casy®1 Cell Counter+Analyser System Model TT	Schärfe Systeme GmbH
C-Chip™ (DHC-N01) Einmal-Zählkammer	PEQLAB
Wasserbad Thermo-Boy	MGW Lauda
Trockenschrank	Binder
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturschalen Ø 60 x 15 mm	TPP®
6-Well-Platten	Greiner
Sterilfilter (0,2 µm Porendurchmesser)	Sartorius
Megafuge 1.0R	Heraeus
RPMI 1640	Biochrom AG
DMEM	BioWhittaker®, Lonza
FCS	Gibco
L-Glutamin (2 mM; 200 mM in 0,85 % NaCl Solution)	PAA; BioWhittaker®, Lonza
PEN-STREP (100 U/ml; 10.000 U/ml)	PAA; BioWhittaker®, Lonza
Ethanol 70 %	MERCK
Trypsin/EDTA	PAA
TGF-β1	Calbiochem
HCl 4 mM	MERCK
BSA	Amresco
bLF	Morinaga Milk Industry
1 x PBS (steril filtriert)	
PMA	Sigma

3.1.2 Sterile Arbeitsbedingungen

Alle Arbeiten in der Zellkultur werden in einer sterilen Laminar-Airflow Werkbank durchgeführt, die über Nacht mit UV-Licht desinfiziert wird. Um mikrobielle Kontaminationen der Zellen zu verhindern, werden ausschließlich sterile oder steril filtrierte Produkte eingesetzt. Plastikpipettenspitzen werden vor Gebrauch autoklaviert (120 °C, 30 Minuten) und anschließend im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet, mehrmals verwendbare Glaswaren werden sterilisiert (180 °C, über Nacht). Zusätzlich werden alle Materialien (Pipettenschachteln, Flaschen) vor Einbringen in die Werkbank, sowie die Hände mit 70%igem Ethanol gereinigt.

3.1.3 Zelllinien

3.1.3.1 Caco-2 Zellen

Caco-2 Zellen wurden 1974 aus einem humanen Kolonadenokarzinom isoliert und als permanente Zelllinie etabliert [FOGH et al., 1977].

Da die adhären, epithelialen Zellen nach spontaner Ausdifferenzierung ähnliche morphologische und funktionelle Charakteristika wie Dünndarmenterozyten zeigen, werden diese häufig als Modell eingesetzt, um das intestinale Epithel zu simulieren und den Transport und Metabolismus von Nährstoffen und Pharmaka in vitro zu untersuchen [PINTO et al., 1983; MEUNIER et al., 1995].

Im Verlauf der Differenzierung kommt es zur Ausbildung von Domes und es entsteht ein polarisierter Monolayer von Zellen mit einer für den Dünndarm charakteristischen hochprismatischen Struktur, Büstensaummikrovilli und einem Schlussleistenkomplex. Dieser wird aus Tight Junctions und Desmosomen gebildet und trennt den apikalen vom basolateralen Bereich [PINTO et al., 1983; HIDALGO et al., 1989]. Während der Polarisierungsphase werden auch für Dünndarmenterozyten typische Markerenzyme wie die Sucrase-Isomaltase, die Laktase, oder die Alkalische Phosphatase exprimiert [PINTO et al., 1983; CHANTRET et al., 1988].

3.1.3.2 THP-1 Zellen

Bei THP-1 Zellen handelt es sich um eine humane leukämische Monozyten-Zelllinie, die 1980 aus dem Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie isoliert wurde [TSUCHIYA et al., 1980].

Die Fähigkeit durch Behandlung mit z.B. Phorbolestern zu Zellen mit morphologischer und funktioneller Charakteristik von Makrophagen heranzureifen, macht diese Zelllinie zu einem geeigneten Modell, um die Monozyten-Makrophagen-Differenzierung in vitro zu untersuchen [TSUCHIYA et al., 1982].

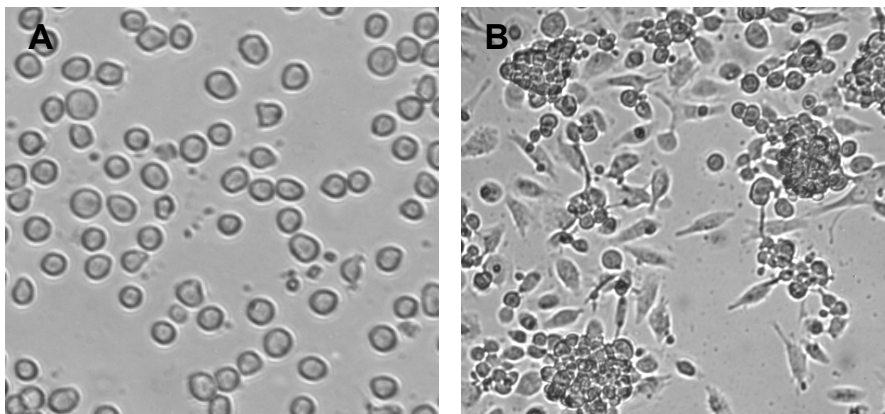


Abbildung 7: Mikroskopische Darstellung der undifferenzierten THP-1 Monozyten (**A**) und der durch PMA-Zusatz zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen (**B**).

Durch Zusatz von PMA (phorbol12-myristat13-acetate) wird die Differenzierung zu Makrophagen induziert [AUWERX et al., 1991]. Diese sind im Vergleich zu monozytären THP-1 Zellen adhärent, zeigen eine geringere Anzahl an Microvilli und Vesikel und sind durch ein ausgeprägteres rauhes Endoplasmatisches Reticulum sowie vermehrtes Auftreten freier Ribosomen charakterisiert.

Differenzierte THP-1 Zellen weisen durch die Expression spezifischer Oberflächenmarker (IgG Fc), Lysozymaktivität und einer gesteigerten Phagozytosekapazität auch funktionelle Eigenschaften aktivierter Makrophagen auf [TSUCHIYA et al., 1982].

3.1.4 Zellkulturmedium

3.1.4.1 RPMI 1640

Für die Kultivierung der THP-1 Zellen wird RPMI 1640 Medium (1640 Roswell Park Memorial Institute) verwendet. Zur Herstellung des Mediums werden 104,3 g des Mediapulvers RPMI 1640 unter Rühren in 9 Liter destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl (37 %) auf 7,25 eingestellt und das Volumen auf 10 Liter aufgefüllt. Anschließend wird das Medium über eine Pumpe steril filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm; Sartorius) und je 450 ml in sterile 500 ml Glasflaschen abgefüllt.

Mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin sowie 0,1 mg/ml Streptomycin komplementiert wird das Nährmedium bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

3.1.4.2 DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium (500 ml) wird mit 10 % FCS, 200 mM L-Glutamin sowie mit 10.000 U/ml PEN-STREP als Nährmedium zum Züchten der Caco-2 Zellen eingesetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C. Vor Verwendung wird das Medium auf 37 °C erwärmt. Für Inkubationen in FCS freiem Medium wird unkomplementiertes Medium zu 1 % mit bovinem Serumalbumin versetzt.

3.1.5 Kultivierung der Zellen

Caco-2 und THP-1 Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

THP-1-Zellen werden als Suspensionszellen in sterilen Kulturflaschen (75 cm²) mit 20-30 ml frischem Nährmedium (RPMI) gezüchtet. Jeden zweiten bis dritten Tag wird das Medium gewechselt und die Zelldichte auf 0,5 x 10⁶ Zellen/ml Medium eingestellt.

Caco-2 Zellen werden in Zellkulturflaschen (25 cm²) alle drei Tage mit je 5 ml frischem Kulturmedium (DMEM) versorgt. Der Wachstumsverlauf sowie morphologische Veränderungen der Zellen werden vor dem Mediumswechsel

unter dem Mikroskop kontrolliert. Kurz vor Erreichen der Konfluenz werden die Zellen 1:5 gesplittet, wobei die Zellablösung durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA erfolgt. Die trypsinisierten Zellen werden anschließend in komplementiertem Medium aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen transferiert oder für Experimente in 6-Well-Platten ausgesetzt.

3.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Unmittelbar nach dem Passagieren der Caco-2 Zellen wird die Zellzahl mittels C-Chip™ bestimmt. Dafür werden 10 µl Zellsuspension in den seitlichen Rand der Zählkammer pipettiert. Anhand eines Zählrasters (9 Quadrate mit definierter Tiefe) kann die Zellzahl pro Milliliter unter dem Lichtmikroskop nach entsprechender Formel ermittelt werden:

$$\boxed{\text{Zellen/ml} = \text{Durchschnittswert/Quadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenfaktor}}$$

Um die Zellzahl und die Viabilität von THP-1 Zellen zu bestimmen, werden 50 µl Zellsuspension in ein CASY® Cup mit 10 ml Casyton-Flüssigkeit pipettiert, das Cup wird geschwenkt und anschließend die gemessene Zellmenge am CASY® abgelesen.

3.1.7 Aussetzen der Zellen

Caco-2 Zellen werden mit einer Dichte von $1-2 \times 10^4$ Zellen/cm² in 6-Well-Platten mit 2 ml Nährmedium pro Well bis zum gewünschten Differenzierungsgrad gezüchtet.

Das Aussetzen undifferenzierter THP-1-Zellen erfolgt in 6-Well-Platten bzw. für den Differenzierungsverlauf in Zellkulturschalen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml. Um die gewünschte Zelldichte pro Milliliter zu erreichen, wird die dafür erforderliche Menge an Zellsuspension in einem 50 ml Röhrchen 5 Minuten bei 820 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in entsprechender Menge frischem Medium resuspendiert.

Zur Differenzierung der THP-1 Zellen werden pro Well 3 ml Zellsuspension mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesetzt und mit PMA in einer Konzentration von 160 nM versetzt. Nach 72 Stunden ist die Differenzierung zu Makrophagen mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml erreicht.

3.1.8 Inkubation

Die Inkubation undifferenzierter THP-1 Zellen erfolgt unmittelbar nach dem Aussetzen. Bei Caco-2 Zellen sowie differenzierten THP-1 Zellen wird eine Stunde vor Inkubation der Zellkulturüberstand abgesaugt und die Zellen mit unkomplementiertem Medium gewaschen. Anschließend wird pro Well 1 ml FCS- bzw. BSA-Medium für FCS freie Inkubationen vorgelegt, in welches die Inkubationslösungen direkt pipettiert werden. Als Inkubationslösungen werden bovines Laktoferrin in 1 x PBS bzw. TGF- β 1 in 4 mM HCl + 0,1 % BSA in den Konzentrationen 50 und 500 μ g/ml bzw. 1 ng/ml eingesetzt. Die Kontrollzellen werden nur mit den Trägersubstanzen behandelt.

Alle Experimente werden bei einer Inkubationsdauer von einer und vier Stunden durchgeführt.

3.2 Lysieren von Zellen

3.2.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Zentrifuge	Eppendorf 5417R
5 x PBS, pH 7,4; 1000ml:	
• 40 g NaCl	Roth
• 14,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	MERCK
• 1g Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4	MERCK
• 1g Kaliumchlorid KCl	MERCK
• 1 M NaOH zur Einstellung des pH-Wertes	MERCK
• mit Aqua dest. auffüllen	
peqGOLD TriFast TM	PEQLAB
Lysis Buffer, pH 7,2; 100ml:	
• 876,6 mg Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan	Roth
• 876,6 mg NaCl	Roth
• 74,4 mg EDTA	MERCK
• 0,5 ml 0,5 % Nonidet-P	USB
• HCl (37 %) zur Einstellung des pH-Wertes	MERCK
• mit Aqua dest. auffüllen	
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma

3.2.2 Lysieren von undifferenzierten THP-1 Zellen

Nach abgelaufener Inkubationszeit werden die 6-Well-Platten aus dem Brutschrank sofort auf Eis gestellt, um Stoffwechselaktivitäten zu stoppen.

Die Suspensionszellen werden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml aus den Wells in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und 5 Minuten bei $820 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml kaltem 1 x PBS resuspendiert und 5 Minuten bei $820 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wird ein zweites Mal wiederholt.

Zur Vorbereitung für die PCR wird das Zellpellet unter dem Abzug bei Raumtemperatur etwa 10 Minuten in 0,5 ml TriFast™ Reagenz gelöst und bis zur weiteren Probenaufbereitung bei -20 °C gelagert.

Für Western Blot-Analysen werden die Zellen mit 80 µl Lysispuffer pro Reaktionsgefäß für 10 Minuten inkubiert. Unmittelbar vor Verwendung wird dem Lysispuffer ein Protease-Inhibitor Cocktail im Verhältnis 100:1 zugesetzt.

Die Zelllysate werden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, auf Eis wieder aufgetaut und für 15 Minuten bei 19400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Proteinbestimmung bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Lysieren von Caco-2 und differenzierten THP-1 Zellen

Alle Arbeitsschritte werden, wie bei undifferenzierten THP-1 Zellen, auf Eis durchgeführt. Da Caco-2 Zellen sowie differenzierte THP-1 Zellen als adhärente Zellen am Well-Boden haften, wird der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit 2 ml kaltem 1 x PBS pro Well gewaschen.

Zur Probengewinnung für die PCR wird pro Well 1 ml bzw. 1,5 ml bei differenzierten Caco-2 Zellen TriFast™ Reagenz unter dem Abzug zugesetzt. Nach einer Inkubation von etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur werden die Zellen von der Well-Oberfläche gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert.

Für Western Blot-Analysen werden subkonfluente Caco-2 Zellen mit 70 µl, postkonfluente Caco-2 Zellen mit 200 µl bzw. differenzierte THP-1 Zellen mit 80 µl Lysispuffer pro Well für 10 Minuten inkubiert, mittels Schaber von den Wells gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wird mit den Zelllysaten wie mit jenen undifferenzierter THP-1 Zellen (s. Kapitel 3.2.1) weiterverfahren.

3.3 Proteinbestimmung (Photometrisch)

3.3.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
<ul style="list-style-type: none">• BCA Protein Solution A; B• Albumin Standard (BSA) 2 mg/ml	
Plattenreader 550	Bio-Rad
8 Kanalphette	Eppendorf 300 Research
96-Well-Platte	Greiner
Parafilm	Manesha
Belly Dancer	Stovall Lifesciences
Prism 3.02	GraphPad

3.3.2 Durchführung

Ausgehend von BSA als Proteinstandard mit einer Konzentration von 2 mg/ml wird zunächst in sechs Schritten durch 1:2 Verdünnung eine Standardreihe erstellt. Als achte Verdünnungsstufe wird destilliertes Wasser eingesetzt. Die Proben werden mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt. Je 10 µl der Standards und der Proben werden im Dreifachansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 200 µl Detektionslösung pro Well versetzt. Die Detektionslösung wird unmittelbar vor Verwendung durch Mischen von BCA Protein Solution A und B im Verhältnis 1:50 hergestellt. Anschließend wird die 96-Well-Platte mit Parafilm abgedeckt und nach kurzem Durchmischen am Belly Dancer für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Platte bei Raumtemperatur etwa 20 Minuten lang abgekühlt ist, wird die Extinktion im Plattenreader bei 550 nm photometrisch gemessen und mit der Software Prism 3.02 ausgewertet.

3.4 Western Blot

3.4.1 SDS-Gelelektrophorese

3.4.1.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

10 % SDS –Lösung, 100ml:

- 10 g SDS ultra pure Roth
- in 100 ml Aqua dest. lösen
- Lagerung bei Raumtemperatur

10 % APS

- 0,1 g Ammoniumpersulfat Pharmacia Biotech
- in 1 ml Aqua dest. lösen
- Lagerung der Aliquote (50 µl) bei -20°C

3 M Tris-HCl/ pH 8,45/0,3 % SDS

- 182 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base Roth
- in 400 ml Aqua dest. lösen
- HCl (37 %) zur Einstellung des pH-Wertes MERCK
- 1,5 g SDS ultra pure Roth
- mit Aqua dest. auffüllen

4 x Sample Buffer, 1000 µl:

- 500 µl Glycerol (87 %) MERCK
- 240 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
- 210 µl Aqua dest.
- 0,8 g SDS Roth
- 50 µl 2-Mercaptoethanol MERCK
- Spatelspitze Bromphenolblau MERCK

10 x Tris-Glycin Buffer; 1000 ml:

- 30 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base Roth
- 144 g Glycin Roth
- 100 ml 10 % SDS-Lösung
- mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei Raumtemperatur

30 % Acrylamid/Bis (29:1)	Sigma
• 29 g Acrylamid	Sigma
• 1 g Bis	Sigma
• in 100 ml Aqua dest. lösen	
TEMED	GERBU
Isopropanol 30 %	MERCK
Ethanol 70 %	MERCK
Glasplatten 0,75 mm	Bio-Rad
10-Well-Kämme 0,75 mm	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® II Apparatur	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas

3.4.1.2 Herstellung der Polyacrylamidgele

Für die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen werden 10%ige Polyacrylamidgele hergestellt.

Dafür werden die gereinigten Glasplatten mit 70 % Ethanol fettfrei gemacht, getrocknet und in die vorgesehene Apparatur eingespannt. Um ein Trenngel mit einer Stärke von 0,75 mm zu erhalten, werden die ersten drei Komponenten nach folgendem Pipettierschema in ein Röhrchen pipettiert und gemischt.

	10% Trenngel	4% Sammelgel
Aqua dest.	2 ml	1,54 ml
3 M Tris-HCl/pH 8,45/0,3% SDS	2 ml	0,62 ml
30 % Acrylamid	2 ml	0,34 ml
10 % APS	30 µl	20 µl
TEMED	3 µl	2 µl

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der Polyacrylamidgele für die Elektrophorese.

Da durch Zugabe von 10 % APS und TEMED die Polymerisation initiiert wird, muss das Gel nach erneutem Durchmischen möglichst rasch bis zur Markierung in den Zwischenraum der beiden Glasplatten gegossen werden.

Um die Bildung von Luftblasen im Gel zu verhindern, wird mit 30%igem Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel nach etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur fest geworden ist, kann das Sammelgel vorbereitet werden. Nach Entfernung des Isopropanols wird die Glasapparatur mehrmals mit destilliertem Wasser gespült und Flüssigkeitsreste werden mit Filterpapier aufgesaugt. Das 4%ige Sammelgel wird analog dem Trenngel hergestellt, wobei die im Pipettierschema angegebene Menge für zwei Gele ausreicht. Das Sammelgel wird bis zum oberen Rand der Apparatur gefüllt und der gereinigte Kamm vorsichtig hineingesteckt. Während das Gel etwa 30 Minuten auspolymerisiert, werden die Proben vorbereitet.

3.4.1.3 Vorbereitung der Proben

Die Proben werden auf Eis aufgetaut und mit frisch hergestelltem Sample Buffer im Verhältnis 1:4 versetzt. Durch Verdünnen mit 1 x PBS werden die Proteinkonzentrationen der Zelllysate laut Proteinbestimmung angeglichen. Die am Vortex gemischten Proben sind bei Raumtemperatur bis zur Beladung der Gele stabil.

3.4.1.4 Beladung der Gele und Elektrophorese

Die Glasplatten mit den fertigen Gelen werden in die Elektrophoresekammer eingespannt, die mit 1 x Tris-Glycin Buffer gefüllt wird. Nach vorsichtigem Entfernen der Kämmen werden die Geltaschen mit einer Spritze gespült und anschließend das jeweilige Probenvolumen (10, 18 oder 25 µl) mit Gelbeladungsspitzen aufgetragen. Als Größenmarker werden 3 µl einer Prestained Protein Ladder in eine freie Tasche pipettiert. Die Elektrophorese wird konstant bei 180 V und 4°C im Kühlschrank für etwa 90 Minuten durchgeführt. Anschließend wird der Elektrophoresepuffer verworfen, die Glasplatten werden der Apparatur entnommen und mittels Spatel vorsichtig voneinander getrennt. Die Glasplatte, an der das Gel haften bleibt, wird nach Abtrennung des Sammelgels weiterverwendet.

3.4.2 Western Transfer Blotting

3.4.2.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Transfer Buffer; 1000 ml:

- 100 ml 10 x Tris-Glycin Buffer
- 200 ml Methanol MERCK
- 10 ml 10 % SDS-Lösung
- mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei 4 °C

Ponceau S; 1000 ml:

- 10 g Ponceau S MERCK
- 300 g Trichloressigsäure MERCK
- 300 g Sulfosalicylsäure
- mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei Raumtemperatur

Pure Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) Trans-Blot[®] Bio-Rad

Mini-Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad

3.4.2.2 Durchführung

Nach elektrophoretischer Auftrennung werden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und anschließend immunologisch detektiert.

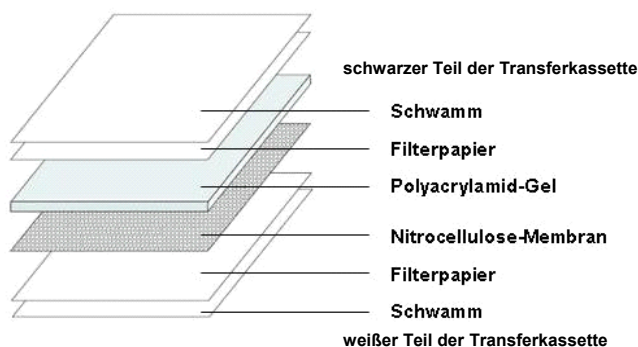


Abbildung 8: Aufbau des Western Blot Sandwich von oben nach unten.

Schwämme, Filterpapier und die Nitrocellulose-Membran werden in Transferpuffer getränkt und das Gel mittels Spatel von der Glasplatte auf die

Membran übertragen. Nach Abdeckung des Gels mit Filterpapier werden durch vorsichtiges Rollen mit einer Glaseprouvette Luftblasen zwischen Gel und Nitrocellulose-Membran entfernt, um Störungen des Transfers zu verhindern. Der schwarze Teil der Transferkassette wird zur schwarzen Seite der Transferapparatur ausgerichtet in die Transferkammer gestellt. Diese wird mit Transfer Buffer gefüllt und ein Eisblock zur Kühlung eingesetzt. Der Transfer läuft bei 400 mA konstant für 45 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C.

Da der Transfer Buffer mehrere Male verwendet wird, sollte die Qualität durch Überprüfen der Spannung (> 100 V) beim Starten des Transfers kontrolliert werden.

Im Anschluss wird die Nitrocellulose etwa 5 Minuten mit Ponceau S gefärbt und der Überschuss durch Waschen mit destilliertem Wasser entfernt, wodurch der Verlauf der rot gefärbten Proteinbanden sichtbar wird. Die Ponceau S-Lösung kann mehrere Male verwendet werden. Die Färbung erlaubt die Effizienz des Transfers zu kontrollieren, und den Blot je nach Größe der verwendeten Antikörper exakt zu schneiden.

3.4.3 Immunodetektion

3.4.3.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

10 x TBS Buffer; pH 7,4, 1000 ml:

- 24,2 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base Roth
- 84,8 g NaCl Roth
- mit Aqua dest. auffüllen
- HCl (37 %) zur Einstellung des pH-Wertes MERCK
- Lagerung bei 4 °C

Washing Buffer; 1000 ml:

- 100 ml 10 x TBS
- 1 ml Tween20 MERCK
- mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei 4 °C

Blocking Buffer

- 2,5 g Magermilchpulver Fixmilch INSTANT
- in 50 ml Washing Buffer gelöst

Primär-Antikörper-Lösung

- 10 ml Washing Buffer
- 0,3 g BSA Amresco
- Spatelspitze Natriumazid NaN_3
- Lagerung bei 4 °C

Sekundär-Antikörper-Lösung

- Goat Anti-rabbit-IgG (H+L)-HRP Conjugate Bio-Rad
- Goat anti-mouse-IgG (H+L)-HRP Conjugate Bio-Rad
- 1:100 000 in Blocking Buffer kurz vor Gebrauch lösen

SuperSignal® West Femto; West Dura

Pierce

Belly Dancer

Stovall Lifesciences

Chemilmager™ 4400

Biozym

AlphaEaseFC-Chemilmager 4400

Alpha Innotec

Prism 3.02

GraphPad

Antikörper	Mol. Gewicht	Isotyp	Verdünnung	Bezugsfirma
pan ERK	42 kDa	Mouse IgG2a	1:5000	BD Biosciences
Phospho-ERK1/2	42,44 kDa	Rabbit IgG	1:1000	Cell Signaling
Phospho-p38	43 kDa	Rabbit IgG	1:2000	Cell Signaling
Smad2	60 kDa	Rabbit IgG	1:1000	Cell Signaling
Phospho-Smad2	60 kDa	Rabbit IgG	1:1000	Cell Signaling
C14-LRP1	85 kDa	Rabbit IgG	1:2000	Neo Systems
Dab2-p96	96 kDa	Mouse IgG	1:2000	BD Biosciences
β-Catenin	92 kDa	Mouse IgG1	1:2000	BD Biosciences
Calnexin	67 kDa	Rabbit IgG	1:5000	Abcam

Tabelle 3: Verwendete Primär-Antikörper, Molekulargewicht, Isotyp, eingesetzte Verdünnung und Bezugsfirma.

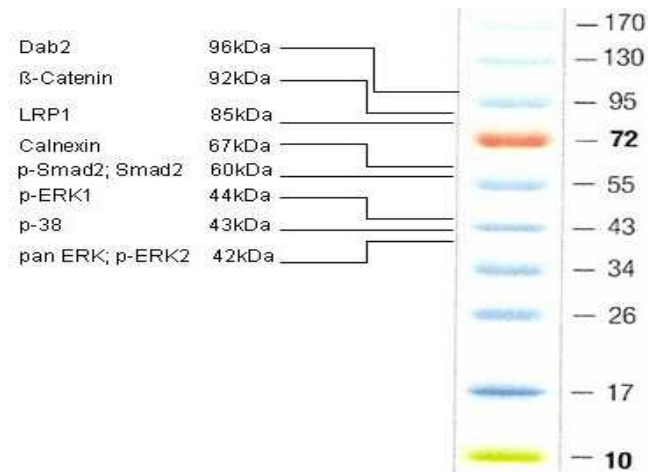


Abbildung 9: Proteinleiter als Referenzmarker für die Größenzuordnung der verwendeten Primär-Antikörper.

3.4.3.2 Durchführung

Im Anschluss an die Ponceau S-Färbung werden alle Arbeitsschritte unter ständiger Bewegung am Belly Dancer durchgeführt.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wird der Blot in Blocking Buffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach zweimaligem Waschen mit Washing Buffer für jeweils 10 Minuten folgt die Inkubation mit je 10 ml Primär-Antikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag werden die Antikörper-Lösungen zur Wiederverwendung in Röhrchen gesammelt. Der Blot wird dreimal 10 Minuten mit Washing Buffer gewaschen und für eine Stunde in 10 ml Sekundär-Antikörper-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschsritten von jeweils 10 Minuten wird der Blot in 500 µl SuperSignal®-ECL-Lösung (Enhancer Solution: Peroxidase Solution 1:1) 5 Minuten inkubiert und anschließend im Chemilmager™ 4400 in Abhängigkeit des jeweiligen Proteins bis zu 40 Minuten belichtet. Die Banden werden semi-quantitativ mit der Software AlphaEaseFC-Chemilmager4400 ausgewertet, wobei die Signalstärke als Integrated Density angegeben wird. Die statistische Auswertung erfolgt mit Microsoft Excel und Prism 3.02.

3.5 RNA-Isolierung - Reverse Transkription - cDNA-Synthese

3.5.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Zentrifuge	Eppendorf 5417R
Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
NanoDrop™ ND 1000	Thermo Scientific
peqGOLD TriFAST™	PEQLAB
DEPC	Sigma
DEPC-Wasser RNasefrei	
<ul style="list-style-type: none"> • 100 µl DEPC • in 1 l Aqua dest. 3 h unter Abzug lösen • 2 h bei 120 °C autoklavieren 	
DEPC-Pipettenspitzen, -Reaktionsgefäße RNasefrei	
<ul style="list-style-type: none"> • in DEPC-Wasser über Nacht tränken • 2 h bei 120 °C autoklavieren; bei 70 °C trocknen 	
Chloroform	MERCK
Isopropanol	MERCK
Ethanol 75 % in DEPC-Wasser	MERCK
Random Hexamer Primer 0,2 µg/µl	Fermentas
Reaction Buffer (5x)	Fermentas
dNTP Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP je 100 mM)	Fermentas
dNTPs 10 mM ; 100 µl:	
<ul style="list-style-type: none"> • 80 µl Aqua dest. steril filtriert • je 5 µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100 mM 	
RiboLock™ RNase Inhibitor 40 U/µl	Fermentas
RevertAid™ M-MuLV ReverseTranskriptase 200 U/µl	Fermentas

3.5.2 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung werden die mit TriFast™ lysierten Zellen unter dem Abzug bei Raumtemperatur aufgetaut und die Zentrifuge auf 4 °C vorgekühlt. In einem zusätzlichen Reinigungsschritt werden zur Entfernung von Polysacchariden und anderen unlöslichen Bestandteilen undifferenzierte THP-1 Zellen 10 Minuten sowie differenzierte Caco-2 Zellen 25 Minuten bei 12 000 x g zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße pipettiert.

Pro eingesetztem ml TriFast™ werden laut Herstellerangabe 200 µl Chloroform zugegeben und 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Eine gute Homogenisierung der beiden Phasen ist für den RNA-Ertrag entscheidend. Die Proben werden 3 Minuten bei Raumtemperatur im Abzug stehen gelassen und anschließend 5 Minuten bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden für die RNA-Präzipitation pro eingesetztem ml TriFast™ 500µl Isopropanol in DEPC-Reaktionsgefäße auf Eis vorgelegt. Durch das Zentrifugieren kommt es zur Phasentrennung: Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, wird in 100 µl-Schritten vorsichtig abgenommen und mit dem Isopropanol gemischt für eine bis zwei Stunden bei -20 °C gelagert. Dabei darf es zu keiner Verunreinigung durch Vermischung mit der DNA-hältigen Interphase bzw. mit der unteren rötlichen Chloroform-Phenol-Phase, in der die Proteine angereichert sind, kommen.

Durch anschließende Zentrifugation bei 12 000 x g und 4 °C für 10 Minuten entsteht ein RNA-Pellet, welches zweimal mit 75%igen Ethanol gewaschen wird. Dafür wird zunächst das Isopropanol verworfen, 1 ml Ethanol zugefügt und die am Vortex gemischte Probe 10 Minuten bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wird ein zweites Mal wiederholt. Danach wird das Ethanol möglichst vollständig entfernt und das Pellet bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes in der Laminar-Airflow Werkbank luftgetrocknet.

3.5.3 Reverse Transkription - cDNA-Synthese

Das fast vollständig getrocknete Pellet wird in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert und 10 Minuten im vorgeheizten Wasserbad bei 55 °C gelöst. Ein Aliquot dieser Lösung wird anschließend zur Messung des RNA-Gehalts (ng/µl) mittels NanoDrop™ herangezogen und eine RNA-Konzentration von 4 µg pro 20 µl-Ansatz durch Verdünnung mit DEPC-Wasser eingestellt.

Je 11,5 µl der in DEPC-Wasser gelösten RNA werden mit 1 µl Random Hexamer Primer in einem PCR-Tube versetzt und 10 Minuten bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Danach werden jeweils 7,5 µl Mastermix zugegeben, der nach folgendem Pipettierschema hergestellt wird:

Substanz	Ausgangs- konzentration	Volumen	End- konzentration
RT Buffer	5x	4 µl	1x
dNTPs	100 mM	2 µl	10 mM
RNAse Inhibitor	40 U/µl	0,5 µl	1 U/µl
Reverse Transkriptase	200 U/µl	0,5 µl	5 U/µl

Tabelle 4: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die cDNA-Synthese.

Nach Zugabe des Mastermix werden die Proben eine Stunde bei 37 °C und 10 Minuten bei 60 °C im Thermocycler inkubiert. Für nachfolgende PCR-Analysen wird die cDNA bei -20 °C gelagert.

3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.6.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Elektrophoresestation	Bio-Rad
Mikrowelle	Moulinex
Sterilfilter (0,45 µm Porendurchmesser)	Sartorius
Aqua dest. steril filtriert	
Buffer Taq buffer + KCl 10 x	Fermentas
MgCl ₂ 25 mM	Fermentas
dNTP Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100 mM)	Fermentas
dNTPs 10 mM ; 100 µl:	
• 80 µl Aqua dest. steril filtriert	
• je 5 µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100 mM	
Taq DNA Polymerase recombinant 1 U/µl	Fermentas
Gen-spezifische Primer 100 µM	VBC-Genomics
• Primerdesign mit PRIMER3 Software	
• 1:10 mit Aqua dest. steril filtriert (10 µM)	
Agarose-Pulver	MERCK
Ehtidumbromid	MERCK
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas
5 x TBE Buffer; 1000 ml:	
• 54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	MERCK
• 27,5 g Borsäure H ₃ BO ₃	MERCK
• 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung	
0,5 M EDTA-Lösung; pH 8, 500 ml:	
• 93 g Titriplex	MERCK
• in 400 ml Aqua dest. lösen	
• 10 N NaOH zur Einstellung des pH-Wertes	MERCK
• mit Aqua dest. auffüllen	

- Lagerung bei Raumtemperatur

6 x Loading Dye	Fermentas
2 UV Transilluminator	UVP
AlphaEaseFC-Chemilmager 4400	Alpha Innotec

3.6.2 Durchführung

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, um selektive Nucleinsäuresequenzen der cDNA exponentiell zu vervielfältigen.

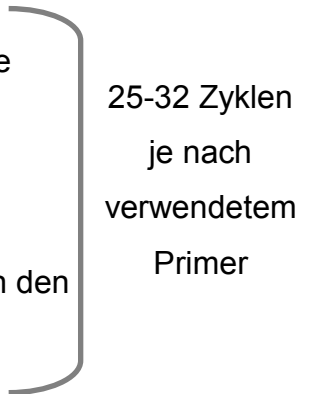
Dafür wird nach Auftauen aller benötigten Reagenzien auf Eis zunächst ein Mastermix hergestellt:

Substanz	Ausgangs- konzentration	Volumen	End- Konzentration
Aqua dest. steril filtriert		31 µl	
Buffer	10 x	5 µl	1 x
MgCl ₂	25 mM	5 µl	2,5 mM
dNTPs	10 mM	4 µl	0,8 mM
Primer (sense/antisense)	10 µM	je 1,5 µl	je 0,3 µM
Taq DNA Polymerase	1 U/µl	1 µl	0,02 U/µl

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die PCR.

49 µl Mastermix werden in einem PCR-Tube mit 1 µl cDNA versetzt, am Vortex gemischt und im Thermocycler inkubiert.

Der PCR-Prozess durchläuft dabei ein zyklisches Temperaturprogramm in folgenden Schritten:

1. Initiale Denaturierung: die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen auf 94 °C in die beiden Einzelstränge aufgetrennt. (3 Minuten)
 2. Denaturierung bei 94 °C. (40 Sekunden)
 3. Annealing: nach Abkühlung auf eine primerspezifische Temperatur (s. Tabelle 5) können diese an die DNA hybridisieren. (60 Sekunden)
 4. Elongation: bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq Polymerase, wird der Zweitstrang ausgehend von den Primern durch Anlagerung von dNTPs synthetisiert. (60 Sekunden)
 5. Finale Elongation bei 72 °C. (5 Minuten)
 6. Store bei 4 °C.
- 
- 25-32 Zyklen
je nach
verwendetem
Primer

Die amplifizierte cDNA-Fragmente können anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und identifiziert werden. Zur Herstellung eines 1,5%igen Gels werden 0,45 g Agarose mit 30 ml 1 x TBE Buffer in einem Becherglas gemischt und in der Mikrowelle aufgeköcht bis eine klare Lösung entsteht. Nach Abkühlung auf etwa 60 °C werden 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung der DNA-Banden zugesetzt und das flüssige Gel in einen Gel-Schlitten mit eingesetztem 8-Well-Kamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wird der Kamm entfernt und das Gel mit dem Schlitten in eine mit 1 x TBE gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt. Die mit 6 x Loading Dye im Verhältnis 1:6 versetzten Proben (15 µl) sowie eine DNA-Leiter als Größenmarker (2,5 µl) werden in die Taschen pipettiert und bei 100 V konstant und 50-60 mA etwa 20 Minuten aufgetrennt. Anschließend werden die unter UV-Licht fluoreszierenden Banden im Transilluminator fotografiert und die Signalstärke mit der Software AlphaEaseFC Chemilmager 4400 ausgewertet.

Primer	bp	°C	Cyc.	Sequenz
GAPDH	185	62	25	5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC-3' 5'-GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC-3'
PAI-1	399	61	30	5'-TGC TGG TGA ATG CCC TCT ACT-3' 5'-CGG TCA TTC CCA GGT TCT CTA-3'
FN-1	439	70	30	5'-AGC CGC CAC GTG CCA GGA TTA C-3' 5'-CTT ATG GGG GTG GCC GTT GTG G-3'
c-Myc	456	63	32	5'-CCT CGG TGG TCT TCC CCT AC-3' 5'-TGC ATT TTC GGT TGT TGC TG-3'
TGF-β1	336	65,8	32	5'-GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC-3' 5'-GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC-3'
TGF-β RI	325	61	30	5'-GGA CTC AGC TCT GGT TGG TG-3' 5'-GGG GCC ATG TAC CTT TTT GT-5'
TGF-β RII	436	61	30	5'-ACG GAG TTG GGG AAA CAA TAC T-3' 5'-GAG ATG TCA TTT CCC AGA GCA C-3'
β-Glycan	436	61	30	5'-CCA AGC ATG AAG GAA CCA AA-3' 5'-GGT GTG GGG TGA ATA CAA CG-3'
Endoglin	368	61	30	5'-AGC TCC CAG ACA CAC CTC AA-3' 5'-GCC ACA GCT GGA GTA AGC AC-3'
LRP-1	515	70	30	5'-CAA CAA CAG CAC CTG CAC TGT CAA CCA G-3' 5'-GGA CTC GCC GCT TAT ACC AGA ATA CCA C-3'
CD 36	428	60	30	5'-TGC CTC TCC AGT TGA AAA CC-3' 5'-GCA ACA AAC ATC ACC ACA CC-3'
MMP-9	339	60	30	5'-GAC ATC GTC ATC CAG TTT GG-3' 5'-GTA GAG TCT CTC GCT GGG GC-3'
MMP-1	787	61,4	30	5'-CGA CTC TAG AAA CAC AAG AGC AAG A-3' 5'-AAG GTT AGC TTA CTG TCA CAC GCT T-3'
MMP-2	605	61,4	30	5'-GTG CTG AAG GAC ACA CTA AAG AAG A-3' 5'- TTG CCA TCC TTC TCA AAG TTG TAG G-3'
LRP-5	344	60	30	5'-CCG GAA GAT CAT TGT GGA CT-3' 5'-CAC AGC GAG TGT GGA AGA AA-3'
β-Catenin	395	60	30	5'-CCA TTC CAT TGT TTG TGC AG-3' 5'-CTG GCC ATA TCC ACC AGA GT-3'
Dab1	396	60	30	5'-TCA TGC CCA CAC AAA CTG TTA-3' 5'-ATG CAG ATG ATT TGG ATG GAG-3'
Dab2	377	60	30	5'-GAC ACG TTG AGG GGG AGT TA-3' 5'- TGA CCA TGG TTG CAC TTG T-3'
TNF-α	315	60	30	5'-TCC TTC AGA CAC CCT CAA CC-3' 5'-GAG GAA GGC CTA AGG TCC AC-3'
Sucrase- Isomaltase	196	60	30	5'-CAT CCT ACC ATG TCA AGA GCC A-3' 5'-GCT TGT TAA GGT GGT CTG GTT T-3'

Tabelle 6: verwendete Primer, Länge des amplifizierten PCR-Produktes, primerspezifische Annealingtemperatur, Zyklenzahl und Sequenzen der verwendeten sense/antisense Primer.

4 ERGEBNISSE

In den letzten Jahren konnte in unserer Arbeitsgruppe in unterschiedlichsten Zelllinien ein zum Teil vergleichbarer Einfluss von Laktoferrin wie von TGF- β 1 auf die Signaltransduktion gezeigt werden. In dieser Arbeit wurden Caco-2 Zellen neben der humanen leukämischen Zelllinie THP-1 als Zellmodell gewählt, um zytokinartige Wirkungen von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 zu untersuchen.

Um mögliche Unterschiede in der Regulation der Signaltransduktion in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades zu ermitteln, wurden zunächst die Grundlevel der Protein- und Genexpression mittels Western Blot und PCR in verschiedenen Differenzierungsstadien von Caco-2 und THP-1 Zellen analysiert und die Ergebnisse in nachfolgenden Abbildungen und Diagrammen vergleichend gegenübergestellt.

In weiterer Folge wurde der Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression ausgewählter Proteine sowie typischer Zielgene nach ein- und vierstündiger Inkubation in unterschiedlichen Differenzierungsstadien von Caco-2 und THP-1 Zellen untersucht.

4.1 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

4.1.1 Vergleich von Caco-2 Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien

Die humanen Kolonkarzinomzellen Caco-2 sind adhärente, epitheliale Zellen, die nach Erreichen der Konfluenz durch Zell-Zell-Kontakt spontan zu einem enterozytenähnlichen Phänotyp differenzieren.

Da sich Caco-2 Zellen im Verlauf der Differenzierung und Polarisierung durch Restrukturierung des Zytoskeletts hinsichtlich ihrer morphologischen und funktionellen Eigenschaften verändern, wurden zunächst Unterschiede beteiligter Mediatoren auf Protein- und transkriptioneller Ebene in undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen mittels Western Blot und PCR analysiert.

4.1.1.1 Expression ausgewählter Proteine in undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen

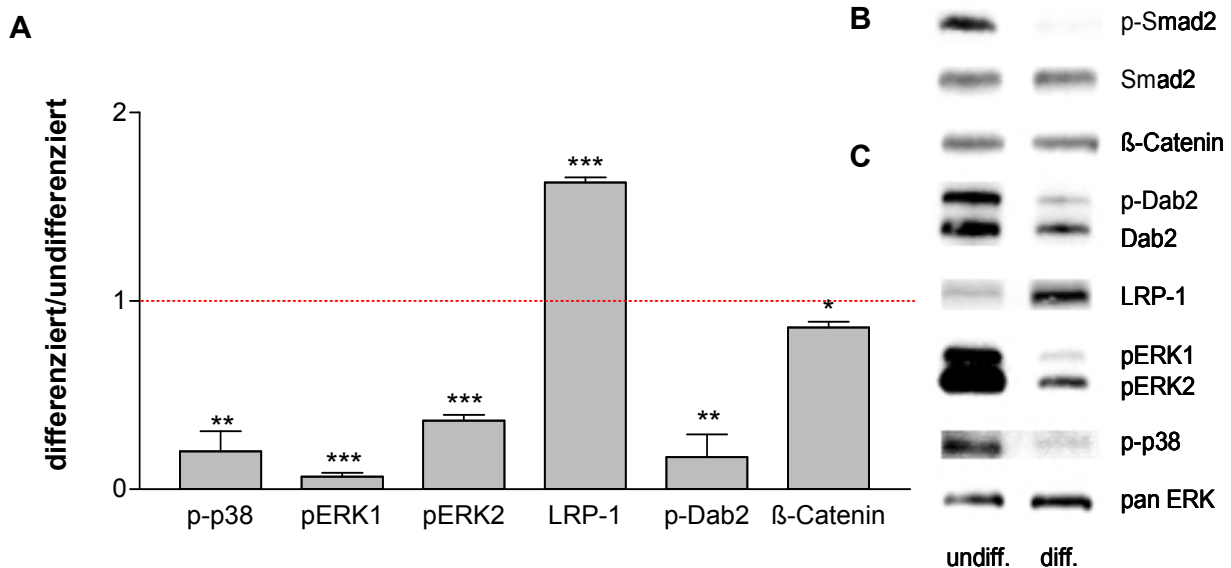


Abbildung 10: Western Blot Grundsignale von p-p38, pERK1, pERK2, LRP-1, p-Dab2, β-Catenin und p-Smad2 in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.

A: Grafische Darstellung des Mittelwerts (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Der Wert undifferenzierter Caco-2 Zellen wurde jeweils auf 1 gesetzt und die Ergebnisse auf die Ladekontrolle normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-test (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

B: Repräsentative Abbildung des p-Smad2-Grundsignals in undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen. Als Ladekontrolle wurde Smad2 verwendet.

C: Repräsentative Abbildungen der Signalstärken von p-p38, pERK1, pERK2, LRP-1, p-Dab2 und β-Catenin differenzierter Caco-2 Zellen (18 d) im Vergleich zur undifferenzierten Form. Als Ladekontrolle wurde pan ERK verwendet.

Abbildung 10 zeigt bei differenzierten Caco-2 Zellen einen statistisch höchst signifikanten ($p < 0,001$) Anstieg der LRP-1-Expression um 60 %, während die Grundlevel der MAPKinasen p-p38 ($p < 0,01$) und pERK1/2 ($p < 0,001$) dramatisch abfallen.

Das Adapterprotein Dab2 wird in beiden Differenzierungsstadien als Doppelbande exprimiert, wobei die obere Bande als phosphorylierte Form (p-Dab2) angenommen wird [ROSENBAUER et al., 2002; HE et al., 2003], und im Vergleich zu undifferenzierten Caco-2 Zellen signifikant ($p < 0,01$) auf weniger als ein Drittel abnimmt. β-Catenin bleibt auf Proteinebene in undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen auf etwa gleichem Level. p-Smad2 ist in undifferenzierten Caco-2 Zellen kaum detektierbar, daher konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

4.1.1.2 Expression ausgewählter Gene in undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen

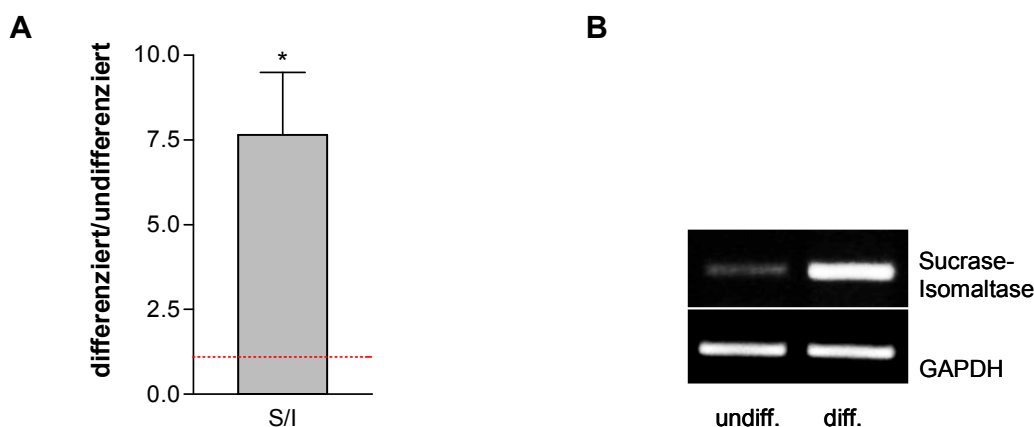


Abbildung 11: Expression des Differenzierungsmarkers Sucrase-Isomaltase in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.

A: Mittelwert (\pm SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert und die Signalstärke undifferenzierter Caco-2 Zellen auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-test (*: $p < 0,05$).

B: Repräsentative Abbildungen der Signalstärke von Sucrase-Isomaltase differenzierter (18 d) und undifferenzierter Caco-2 Zellen. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Sucrase-Isomaltase steigt im Zuge der Zelldifferenzierung signifikant ($p < 0,05$) auf das 7.5-fache an und gilt in der Literatur als Differenzierungsmarker von Caco-2 Zellen [CHANTRET et al., 1988; MARIADASON et al., 2000].

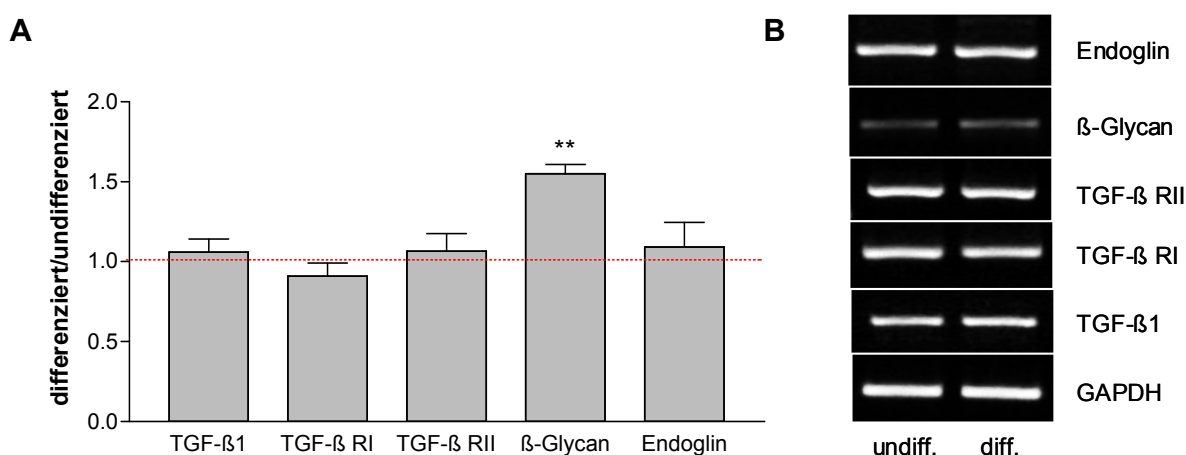


Abbildung 12: Expression von TGF- β 1 und TGF- β -(Co-)Rezeptoren in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.

A: Grafische Darstellung des Mittelwerts (\pm SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert und der Wert undifferenzierter Caco-2 Zellen auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-test (**: $p < 0,01$).

B: Repräsentative Abbildungen der Expression von TGF- β 1, den TGF- β -Rezeptoren Typ I und Typ II sowie TGF- β -Co-Rezeptoren β -Glycan und Endoglin differenzierter Caco-2 Zellen (18 d) im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet.

Abgesehen von einem signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg von β -Glycan um etwa 50 %, kann keine Änderung in der Signalstärke von TGF- β 1 sowie von den im TGF- β -Pathway beteiligten (Co-)Rezeptoren zwischen undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen festgestellt werden.

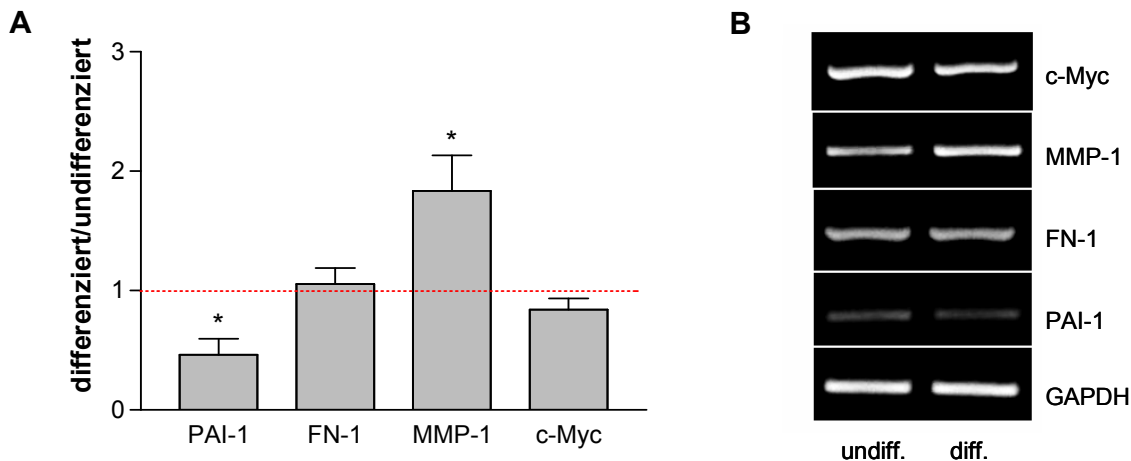


Abbildung 13: PCR-Grundsignale der Zielgene PAI-1, FN-1, MMP-1 und c-Myc in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.

A: Grafische Darstellung des Mittelwerts (\pm SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden jeweils auf GAPDH normalisiert und der Wert undifferenzierter Caco-2 Zellen auf 1 gesetzt. Für die statistische Auswertung wurde der one-sample-t-test herangezogen (*: $p < 0,05$).

B: Repräsentative Abbildungen der Expression von PAI-1, FN-1, MMP-1 und c-Myc differenzierter (18 d) im Vergleich zu undifferenzierten Caco-2 Zellen. Als interner Standard wurde GAPDH verwendet.

In Abbildung 13 wird ersichtlich, dass in differenzierten Caco-2 Zellen, verglichen mit der undifferenzierten Form, die Signalstärke von PAI-1 statistisch signifikant ($p < 0,05$) um etwa 50 % reduziert ist, wohingegen die MMP-1 Expression auf beinahe das Doppelte signifikant ($p < 0,05$) ansteigt. Zudem ist auch ein schwacher, jedoch nicht signifikanter, Rückgang der c-Myc-Expression zu beobachten. Fibronectin bleibt auf RNA-Ebene hingegen unverändert. Da weder bei undifferenzierten noch bei differenzierten Caco-2 Zellen ein MMP-9-Signal detektierbar war, konnte keine bildliche Dokumentation und statistische Auswertung erfolgen.

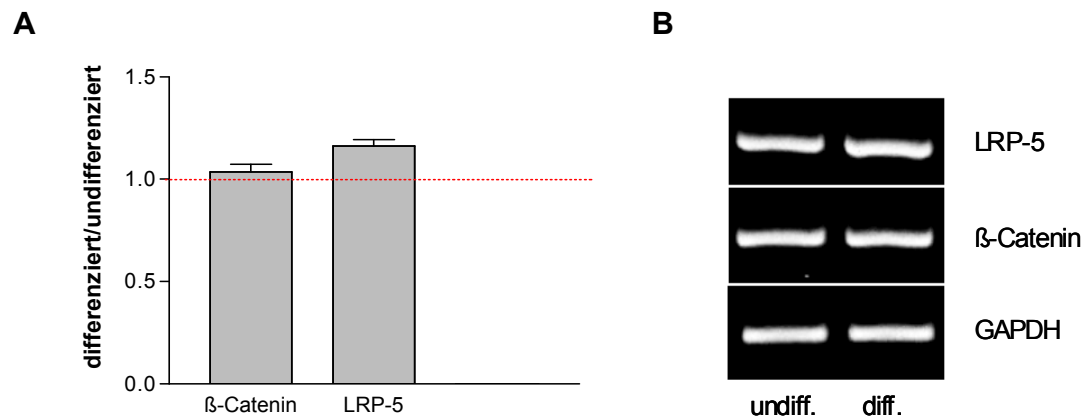


Abbildung 14: Grundlevel der β -Catenin- und LRP-5-Signale in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.

A: Grafische Darstellung des Mittelwerts (\pm SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden jeweils auf GAPDH normalisiert und der Wert undifferenzierter Caco-2 Zellen auf 1 gesetzt. Für die statistische Auswertung wurde der one-sample-t-test herangezogen (*: $p < 0,05$).

B: Repräsentative Abbildungen der Signalstärken von β -Catenin und LRP-5 differenzierter Caco-2 Zellen (18 d) im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. GAPDH wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

Bei der Expression von β -Catenin, einer Schlüsselkomponente des Wnt-/ β -Catenin-Pathways, ist auf RNA-Ebene wie auch auf Proteinebene kein Unterschied in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades erkennbar. Ebenso wird der Co-Rezeptor LRP-5 in undifferenzierten und differenzierten Caco-2 Zellen in etwa gleichem Maße exprimiert.

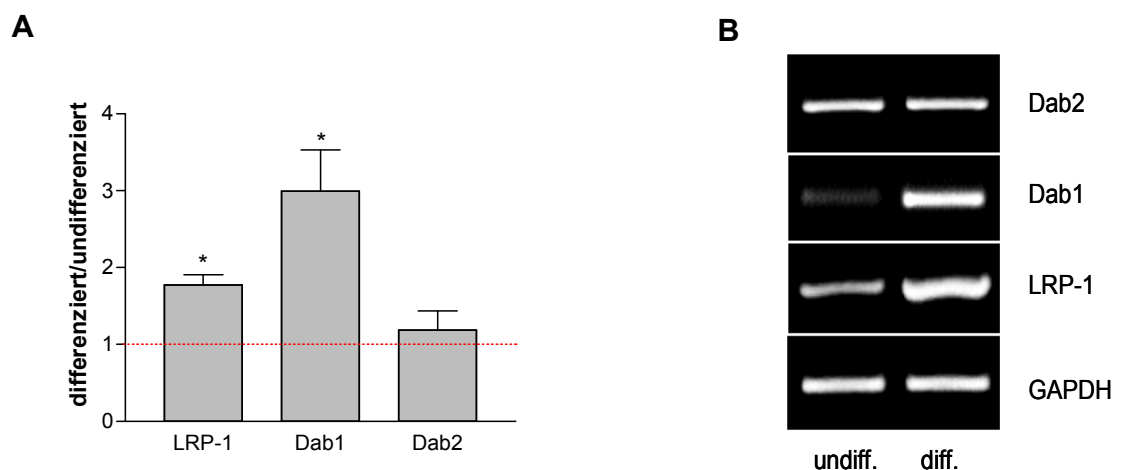


Abbildung 15: PCR-Grundsignale von LRP-1, Dab1 und Dab2 in undifferenzierten und differenzierten (18 d) Caco-2 Zellen.

A: Grafische Darstellung des Mittelwerts (\pm SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden jeweils auf GAPDH normalisiert und der Wert undifferenzierter Caco-2 Zellen auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-test (*: $p < 0,05$).

B: Repräsentative Abbildungen der Expression von LRP-1, Dab1 und Dab2 differenzierter Caco-2 Zellen (18 d) im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. GAPDH wurde als interner Standard verwendet.

In Übereinstimmung mit den Western Blot Ergebnissen steigt die Expression von LRP-1 in differenzierten Caco-2 Zellen signifikant ($p < 0,05$) auf das Zweifache an. Gleichzeitig wird auch das Adapterprotein Dab1 signifikant auf das Dreifache hinaufreguliert. Dab2, welches auf Proteinebene in differenzierten Zellen um mehr als zwei Drittel reduziert wird, bleibt auf transkriptioneller Ebene in beiden Differenzierungsstadien auf etwa gleichem Niveau.

4.1.2 Vergleich von THP-1 Zellen im Differenzierungsverlauf

Die humanen leukämischen THP-1 Monozyten reifen in Zellkulturschalen nach 72-stündiger Inkubation mit PMA (160 nM) zu makrophagenähnlichen Zellen heran und werden im Abstand von 24 Stunden, wie bereits unter Material und Methoden (s. Kapitel 3.2) beschrieben, für PCR- bzw. Western Blot-Analysen lysiert und aufbereitet.

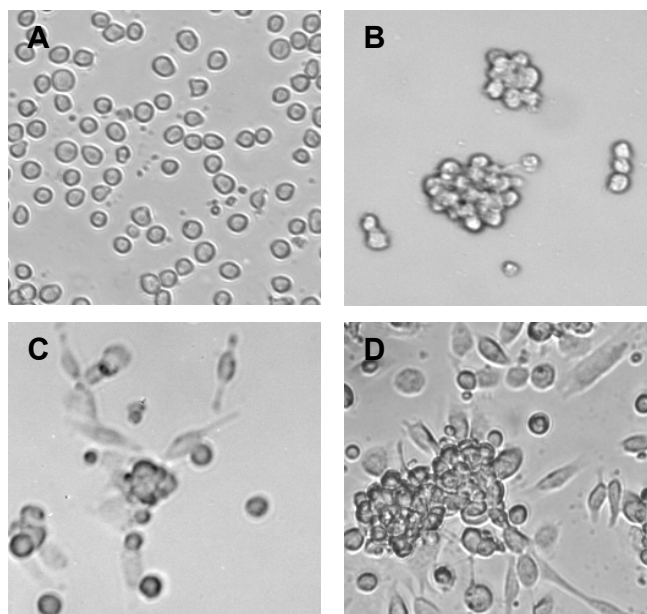


Abbildung 16: Mikroskopische Darstellung von THP-1 Zellen im Verlauf der Differenzierung. Monozytäre THP-1 Zellen (A) sowie durch PMA-Stimulierung (160 nM) differenzierte THP-1 Zellen nach 0 (A), 24 (B), 48 (C) und 72 (D) Stunden in 20-facher Vergrößerung.

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass sich die einzelnen, runden, monozytären Suspensionszellen nach 24 Stunden zu Gruppen formieren und bereits beginnen, sich an der Oberfläche anzulagern. Nach 48 Stunden nimmt der Anteil an adhärenzhaften Zellen zu und es bilden sich erstmals für Makrophagen charakteristische Ausläufer. Nach 72 Stunden ist die Differenzierung zu

adhärenten Zellen mit morphologischen und funktionellen Eigenschaften reifer Makrophagen abgeschlossen.

Die Adhärenz gilt auch als wesentlicher Stimulus für die Modulation der Protein- und Genexpression [THORENS et al., 1987], die nachfolgend im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen analysiert wurde.

4.1.2.1 Proteinexpression im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung

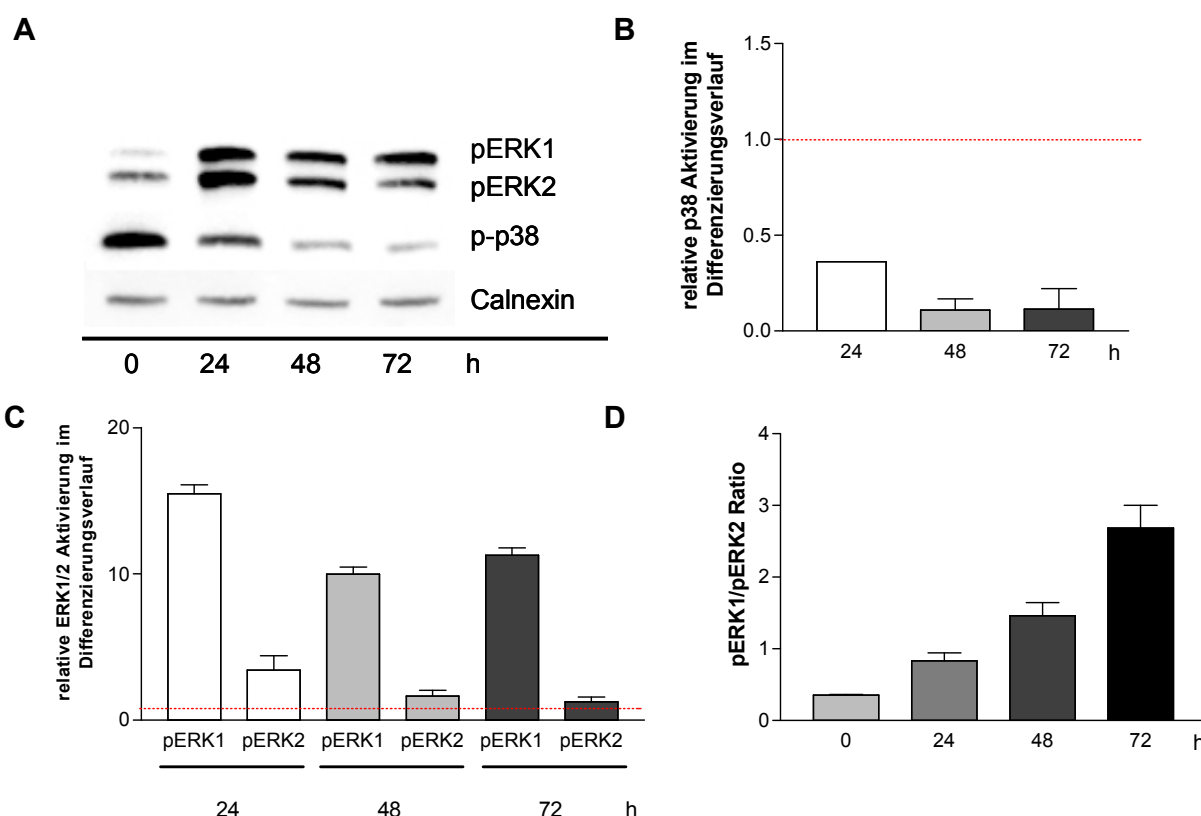


Abbildung 17: Western Blot Grundsignale der MAPKinasen p38, ERK1 und ERK2 in phosphorylierter Form im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung.

A: Repräsentative Abbildungen der relativen Signalstärken von p-p38, pERK1, pERK2. Calnexin wurde als Ladekontrolle verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen p-p38-Expression im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen. Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils im Duplikat durchgeführt. Der Wert undifferenzierter THP-1 Zellen wurde jeweils auf 1 gesetzt.

C: Grafische Darstellung des relativen pERK1/2-Aktivierungsgrades. Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen, jeweils im Duplikat durchgeführten Experimenten. Der Wert undifferenzierter THP-1 Zellen zum Zeitpunkt 0 wurde jeweils auf 1 gesetzt.

D: Grafische Darstellung des Verhältnisses von pERK1 zu pERK2 im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen.

In Abbildung 17 ist nach 24-stündiger Differenzierung eine Abnahme des p38-Aktivierungszustandes um etwa 60 % erkennbar. Dieser sinkt mit der Ausbildung vereinzelter Makrophagen nach 48 Stunden um weitere 30 % ab

und bleibt auch nach 72 Stunden bei vollständig ausdifferenzierten Zellen auf diesem Niveau, das etwa 10 % des Aktivierungsgrades undifferenzierter THP-1 Zellen entspricht.

Umgekehrt wird ERK1/2 zum Zeitpunkt 0 kaum aktiviert. pERK1 steigt jedoch in PMA-stimulierten Zellen nach 24 Stunden dramatisch auf mehr als das Fünfzehnfache bzw. pERK2 auf beinahe das Vierfache an, um sich nach einer Schwankung beim 48 Stunden Zeitpunkt auf eine mehr als zehnfache Stimulierung bei pERK1 bzw. bei pERK2 auf Kontrollniveau in ausdifferenzierten Makrophagen einzupendeln.

Gleichzeitig kehrt sich auch im Zuge des Differenzierungsprozesses das Verhältnis von pERK1 zu pERK2 um. Die grafische Darstellung des pERK1/2 Ratios verdeutlicht, dass THP-1 Monozyten mit einem Ratio von 0,35 die schwächste pERK1-Bande zeigen, während 24 Stunden nach Stimulierung der Zelldifferenzierung pERK1 und pERK2 etwa gleich stark ausgeprägt sind. Bis zum 72 Stunden Zeitpunkt nimmt die Signalstärke von pERK1 mit fortschreitender Ausbildung ausgereifter Makrophagen jeweils um etwa 50 % zu und erreicht ein Ratio von 2,68.

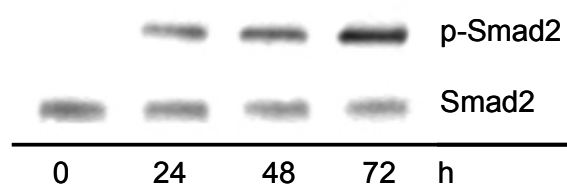


Abbildung 18: Western Blot Grundsignal von p-Smad2 im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung. Repräsentative Abbildung der Smad2-Aktivierung im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen. Als Ladekontrolle wurde Smad2 verwendet.

Abbildung 18 zeigt, dass Smad2 erst 24 Stunden nach PMA-Zusatz aktiviert wird, wobei die Signalstärke im Verlauf der Differenzierung deutlich zunimmt. Da p-Smad2 zum Zeitpunkt 0 in zwei unabhängigen, jeweils im Duplikat durchgeführten Experimenten nicht detektierbar war, konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

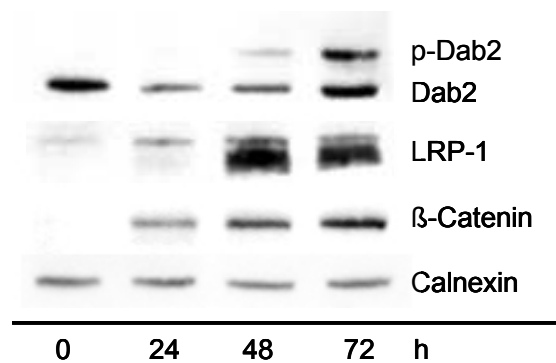


Abbildung 19: Western Blot Grundsignale von β -Catenin, LRP-1 und p-Dab2 im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen. Repräsentative Abbildungen der Expression von β -Catenin, LRP-1 und p-Dab2. Als Ladekontrolle wurde Calnexin verwendet.

Da β -Catenin, LRP-1 und p-Dab2 in undifferenzierten THP-1 Zellen nicht exprimiert werden, konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

β -Catenin-Level steigen, vergleichbar mit der p-Smad2-Expression, ab dem 24 Stunden Zeitpunkt zunehmend an, wohingegen LRP-1 und p-Dab2 erst nach 48 Stunden stimuliert werden. Während die LRP-1-Expression bereits nach 48 Stunden das Niveau voll ausgereifter Makrophagen erreicht, nimmt jene von p-Dab2 bis zum 72 Stunden Zeitpunkt noch deutlich zu.

4.1.2.2 Genexpression im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen

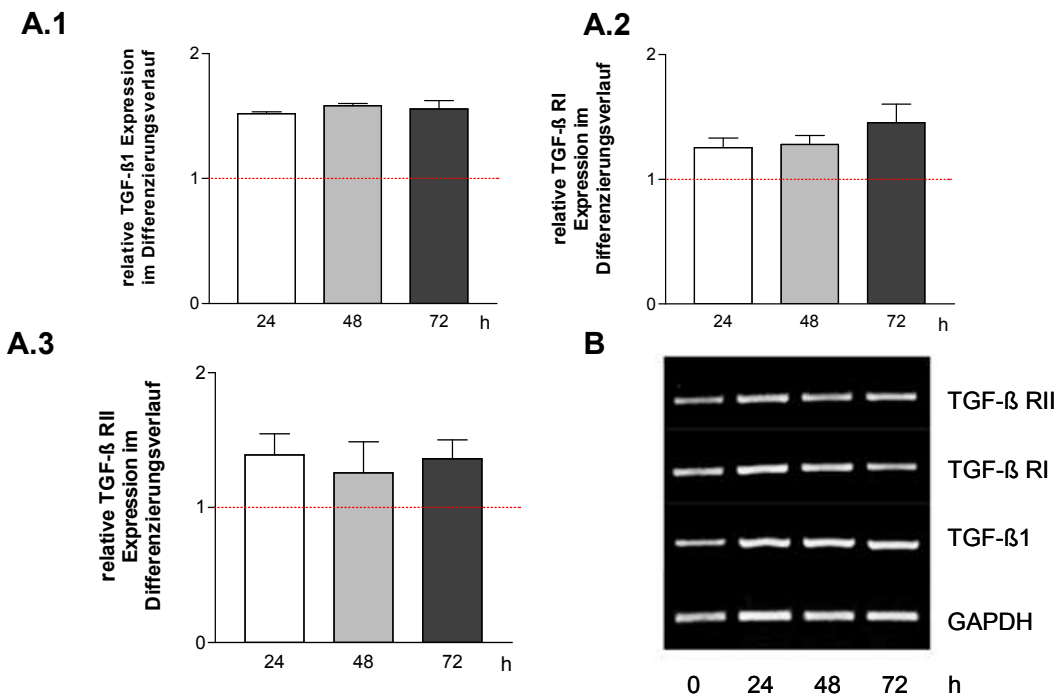


Abbildung 20: Expression von TGF-β1 und TGF-β-(Co-)Rezeptoren im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen.

A: Grafische Darstellung der Grundlevel von TGF-β1 (**A.1**) und den TGF-β-Rezeptoren Typ I (**A.2**) und Typ II (**A.3**) im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung. Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils im Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse wurden jeweils auf GAPDH normalisiert und der Wert undifferenzierter THP-1 Zellen auf 1 gesetzt.

B: Repräsentative Abbildungen der relativen Grundsignale von TGF-β1 und von TGF-β-Rezeptor Typ I und Typ II. GAPDH wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

Im Vergleich zu THP-1 Monozyten nimmt die Expression von TGF-β1 auf transkriptioneller Ebene in differenzierten Zellen bereits nach 24 Stunden um etwa 60 % zu und bleibt auch im weiteren Verlauf der Differenzierung auf diesem Niveau. Zudem zeigen auch die im TGF-β-Signalweg beteiligten Rezeptoren Typ I und Typ II zu allen Zeitpunkten des Differenzierungsprozesses eine gesteigerte Expression, die bei Typ I von 30 % zum 24 bzw. 48 Stunden Zeitpunkt bis auf mehr als 40 % in ausdifferenzierten THP-1 Zellen weiter zunimmt und bei Typ II etwa 30 % im Vergleich zu THP-1 Monozyten beträgt.

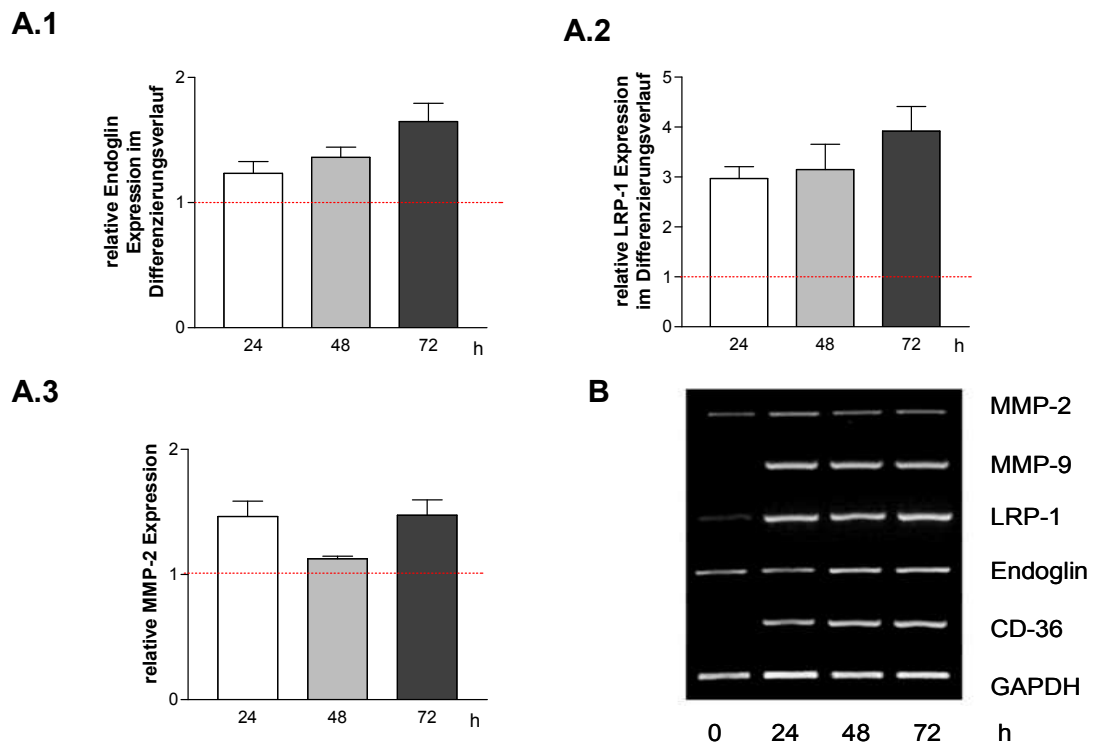


Abbildung 21: Grundsichnale der Differenzierungsmarker CD-36, Endoglin, LRP-1 und MMP-9 sowie von MMP-2 im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung.

A: Grafische Darstellung der relativen Endoglin (**A.1**)-, LRP-1 (**A.2**)- und MMP-2 (**A.3**)-Expression im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung. Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils im Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse wurden jeweils auf GAPDH normalisiert und der Wert zum Zeitpunkt 0 auf 1 gesetzt.

B: Repräsentative Abbildungen der Signalstärken von CD-36, Endoglin, LRP-1, MMP-9 und MMP-2. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

CD-36, Endoglin, LRP-1 und MMP-9 werden im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung verstärkt exprimiert und gelten als Differenzierungsmarker für Makrophagen [HUH et al., 1996; O'CONNELL et al., 1992; WATANABE et al., 1994; XIE et al., 1998]. Während Endoglin bereits in monozytären THP-1 Zellen nachweisbar ist, können LRP-1 nur schwach bzw. CD-36 und MMP-9 nicht detektiert werden.

24 Stunden nach PMA-Zusatz beträgt die LRP-1-Expression bereits das Dreifache des Wertes undifferenzierter THP-1 Zellen und steigert sich bis zur vollständigen Entwicklung ausgereifter Makrophagen nach 72 Stunden auf das Vierfache. Dagegen ist der Anstieg der Endoglin-Signalstärke nach 24-stündiger Inkubation von etwa 20 % marginal, erreicht jedoch zum 48 Stunden Zeitpunkt mehr als 40 % bzw. nach 72 Stunden 60 %.

CD-36 und MMP-9 werden über den Zeitraum der Differenzierung etwa gleich stark exprimiert. Da die Signale zum Zeitpunkt 0 fehlen, konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

Im Unterschied zu MMP-9 kann ein schwaches Signal von MMP-2 in THP-1 Monozyten detektiert werden. Bereits 24 Stunden nach PMA-induzierter Differenzierung erreicht die MMP-2 Expression mit einem Anstieg von 50 % etwa das Niveau ausgereifter Makrophagen, fällt jedoch im Differenzierungsverlauf beim 48 Stunden Zeitpunkt beinahe auf das Level undifferenzierter Zellen zurück.

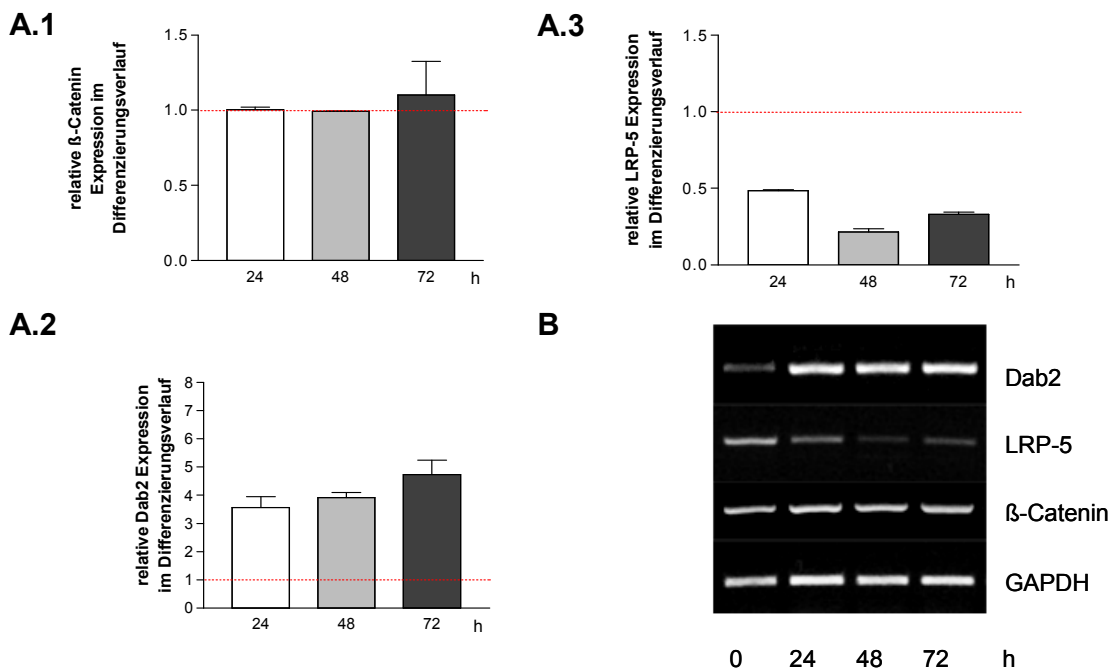


Abbildung 22: PCR-Grundsignale von β -Catenin, LRP-5 und Dab2 im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung.

A: Grafische Darstellung der relativen β -Catenin(**A.1**)-, LRP-5(**A.2**)- und Dab2(**A.3**)-Expression im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen. Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils im Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse wurden jeweils auf GAPDH normalisiert und der Wert zum Zeitpunkt 0 auf 1 gesetzt.

B: Repräsentative Abbildungen der Signalstärken von β -Catenin, LRP-5 und Dab2. GAPDH wurde als Housekeeping-Gen eingesetzt.

Da β -Catenin über den Abbau reguliert wird, ist im Gegensatz zu den Western Blot Ergebnissen auf transkriptioneller Ebene in allen Differenzierungsstadien eine gleichmäßige Expression erkennbar. Hingegen ist die Signalstärke des Co-Rezeptors LRP-5 nach 24 Stunden um die Hälfte reduziert und fällt im weiteren Differenzierungsverlauf bis auf 33 % des Wertes zum Zeitpunkt 0 ab.

Im Vergleich zu den Ergebnissen auf Proteinebene ist Dab2 auf RNA-Ebene in undifferenzierten THP-1 Zellen schwach nachweisbar und wird im Verlauf der Zelldifferenzierung stufenförmig von mehr als dem Dreifachen, über das Vierfache zum 48 Stunden Zeitpunkt bis auf das Fünffache nach 72 Stunden hinaufreguliert. Im Unterschied zu Caco-2 Zellen bleibt die Expression von Dab1 in THP-1 Zellen völlig aus, sodass weder ein bildliche noch eine statistische Auswertung erfolgen konnte.

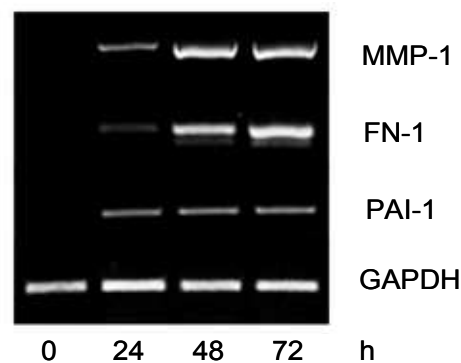


Abbildung 23: Repräsentative Abbildung der Expression von PAI-1, FN-1 und MMP-1 im Differenzierungsverlauf von THP-1 Zellen. GAPDH wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

Die Gene PAI-1, FN-1 und MMP-1 zeigen in undifferenzierten THP-1 Zellen keine Signale und konnten daher statistisch nicht ausgewertet werden. Während PAI-1 im Zeitverlauf der Differenzierung relativ gleichmäßig exprimiert wird, steigt die Signalstärke von FN-1 stufenartig und jene von MMP-1 ab dem 48 Stunden Zeitpunkt deutlich an.

4.1.2.3 Genexpression in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen

Um die Expression ausgewählter Zielgene in THP-1 Zellen jener in Caco-2 Zellen vergleichend gegenüberzustellen, wurde zusätzlich zum Differenzierungsverlauf ein Zellvergleich der beiden Endpunkte durchgeführt und statistisch ausgewertet.

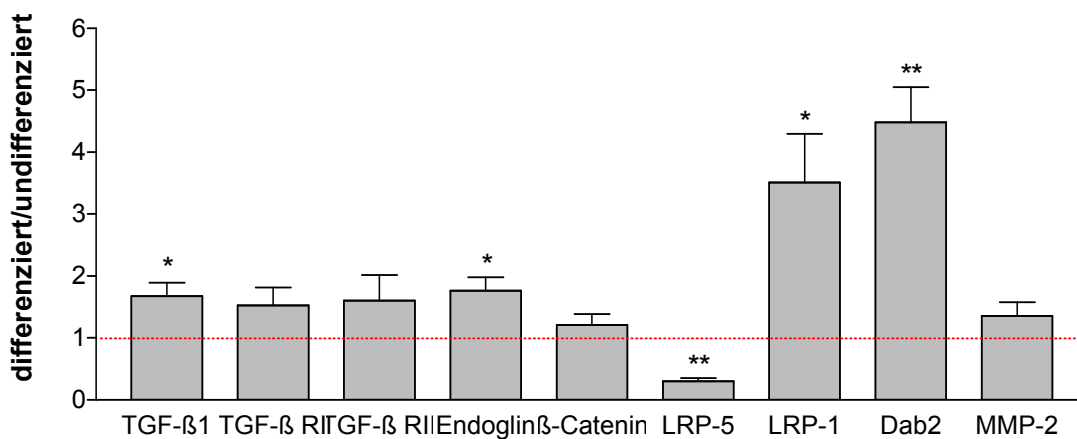


Abbildung 24: Vergleich der Genexpression in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen.

Grafische Darstellung der relativen Expression von TGF-β1, TGFβ-Rezeptor Typ I und II, Endoglin, β-Catenin, LRP-5, LRP-1, Dab1 und Dab2 in undifferenzierten THP-1 Zellen. Mittelwerte (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten, die mittels one-sample-t-test statistisch ausgewertet wurden (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Die Ergebnisse wurden jeweils auf GAPDH normalisiert und der Wert undifferenzierter THP-1 Zellen auf 1 gesetzt.

Abbildung 24 zeigt im Gegensatz zu Caco-2 Zellen, eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) um etwa 70 % verstärkte Expression von TGF-β1 und Endoglin in differenzierten THP-1 Zellen. Zudem nehmen die beiden TGF-β-Rezeptoren Typ I und Typ II um etwa 50 % und 60 %, jedoch statistisch nicht signifikant, zu. Die β-Catenin-Level bleiben in beiden Differenzierungsstadien von THP-1 Zellen vergleichbar mit Caco-2 Zellen unverändert, wohingegen die LRP-5-Expression in THP-1 Makrophagen signifikant ($p < 0,05$) um mehr als die Hälfte abnimmt. Wie in Caco-2 Zellen ist auch in differenzierten THP-1 Zellen ein signifikanter Anstieg von LRP-1 erkennbar, der mit einer mehr als dreifachen Stimulierung im Vergleich zu THP-1 Monozyten sogar noch ausgeprägter ist.

Die Signalstärke von MMP-2 nimmt gegenüber jener monozytärer THP-1 Zellen um etwa die Hälfte zu, wohingegen MMP-9, CD-36, MMP-1, FN-1, und PAI-1 ausschließlich in differenzierten Zellen exprimiert werden, wodurch keine statistische Auswertung erfolgen konnte.

Zielproteine	CaCo-2	THP-1
p-Smad2	↓↓↓	↑↑↑
p-p38	↓↓↓	↓↓↓
pERK1/2	↓↓	↑↑
LRP-1	↑↑↑	↑↑↑
β-Catenin	↔	↑↑↑
p-Dab2	↓↓↓	↑↑
Zielgene		
LRP-1	↑↑	↑↑↑
Dab1	↑↑↑	-
Dab2	↔	↑↑↑
β-Catenin	↔	↔
LRP-5	↔	↓↓↓
TGF-β1	↔	↑
TGF-β RI	↔	↑
TGF-β RII	↔	↑
Endoglin	↔	↑↑
β-Glycan	↑	
PAI-1	↓	↑↑↑
FN-1	↔	↑↑↑
MMP-1	↑↑	↑↑↑
MMP-9	-	↑↑↑
MMP-2		↑
c-Myc	↓	
CD-36	-	↑↑↑
Sucrase-Isomaltase	↑↑↑	-

Tabelle 6: Überblick über die Regulierung der Gen- und Proteinexpression in differenzierten Caco-2 und THP-1 Zellen im Vergleich zu den undifferenzierten Formen.

↑ Anstieg der Expression; ↓ Abnahme der Expression; ↔ gleichbleibende Expression; - keine Expression detektierbar.

4.2 Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Signaltransduktion in verschiedenen Differenzierungsstadien von Caco-2 Zellen

Wie bereits im Literaturüberblick erläutert (s. Kapitel 2.2.1), spielen Smadproteine als intrazelluläre Mediatoren im TGF- β -Signaltransduktionsweg eine zentrale Rolle. In vorangegangenen Studien wurde bereits in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen, dass auch Laktoferrin über diesen Pathway signalisiert und damit wie TGF- β 1 selbst die Phosphorylierung und nukleäre Translokation von Smad2 induziert. Aus der Literatur ist bekannt, dass Caco-2 Zellen im Zuge der Differenzierung eine Resistenz gegenüber antiproliferativen Effekten von TGF- β 1 entwickeln, bedingt durch eine Inaktivierung bzw. Beeinträchtigung des TGF- β -Pathway [NICOLÁS und HILL, 2003; JAKOWLEW, 2006]. Daher wurde nachfolgend die Smad-Aktivierung in Antwort auf TGF- β 1 und Laktoferrin im Caco-2 Zellmodell untersucht.

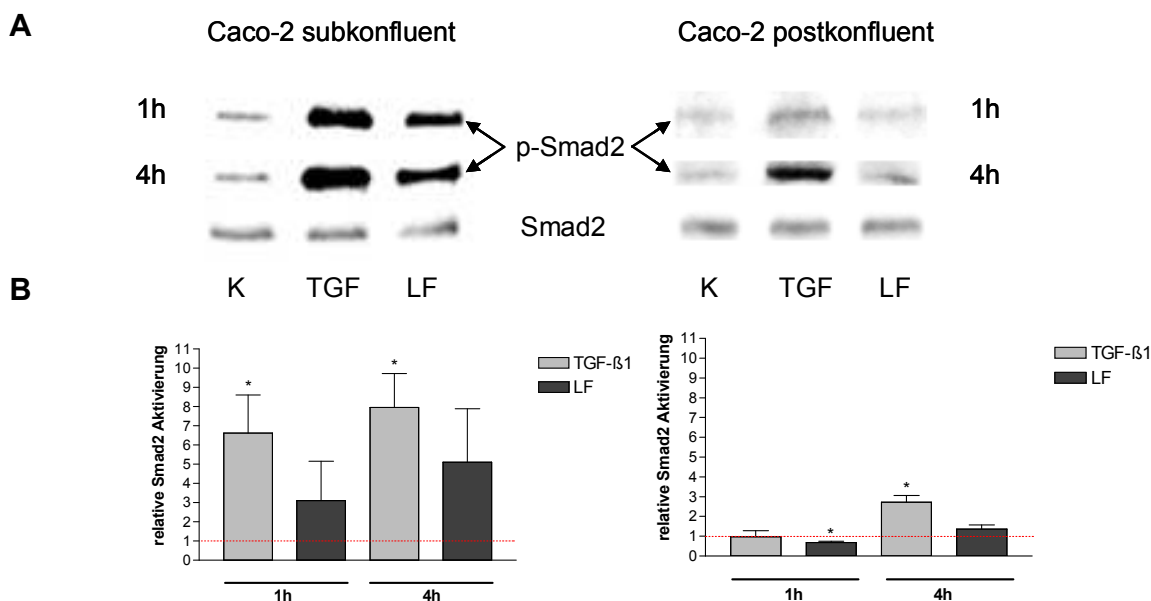


Abbildung 25: Effekt von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivierung von Smad2 in subkonfluenten und postkonfluenten Chaco- 2 Zellen.

A: Repräsentative Abbildungen der Western Blot Signale von p-Smad2 nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml) in sub- und postkonfluenten Caco-2 Zellen. Als Ladekontrolle wurde Smad2 verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen Smad2-Aktivierung in sub- und postkonfluenten Caco-2 Zellen. Mittelwerte (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten, die statistisch mittels one-sample-t-test ausgewertet wurden (*: $p < 0,05$). Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt.

Die Western Blot Ergebnisse (Abbildung 25) zeigen bei subkonfluenten Caco-2 Zellen bereits nach einer Stunde eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Stimulierung von p-Smad2 auf mehr als das Sechsfache durch TGF- β 1, die nach vier Stunden noch dramatischer auf mehr als das Siebenfache des Wertes der Kontrolle ansteigt. Die Laktoferrin-induzierte Smad2-Aktivierung ist im Vergleich zu TGF- β 1 geringer, erreicht aber dennoch nach einer Stunde das Dreifache bzw. nach vier Stunden das Fünffache des Kontrollwertes. Bei postkonfluenten Caco-2 Zellen ist nur nach vier Stunden durch TGF- β 1 eine deutliche Smad2-Aktivierung feststellbar.

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- β 1 und Laktoferrin nicht nur über den TGF- β -Pathway signalisieren, sondern auch den MAPKinase-Pathway aktivieren, während MAPKinasen wie ERK1/2 oder p38 auf allen Ebenen wiederum auf die Smad-Signaltransduktion zurückwirken können. Daher wurde im nächsten Schritt der Einfluss von bLF im Vergleich zu TGF- β 1 auf den Aktivierungszustand dieser MAPKinasen mittels Western Blot analysiert.

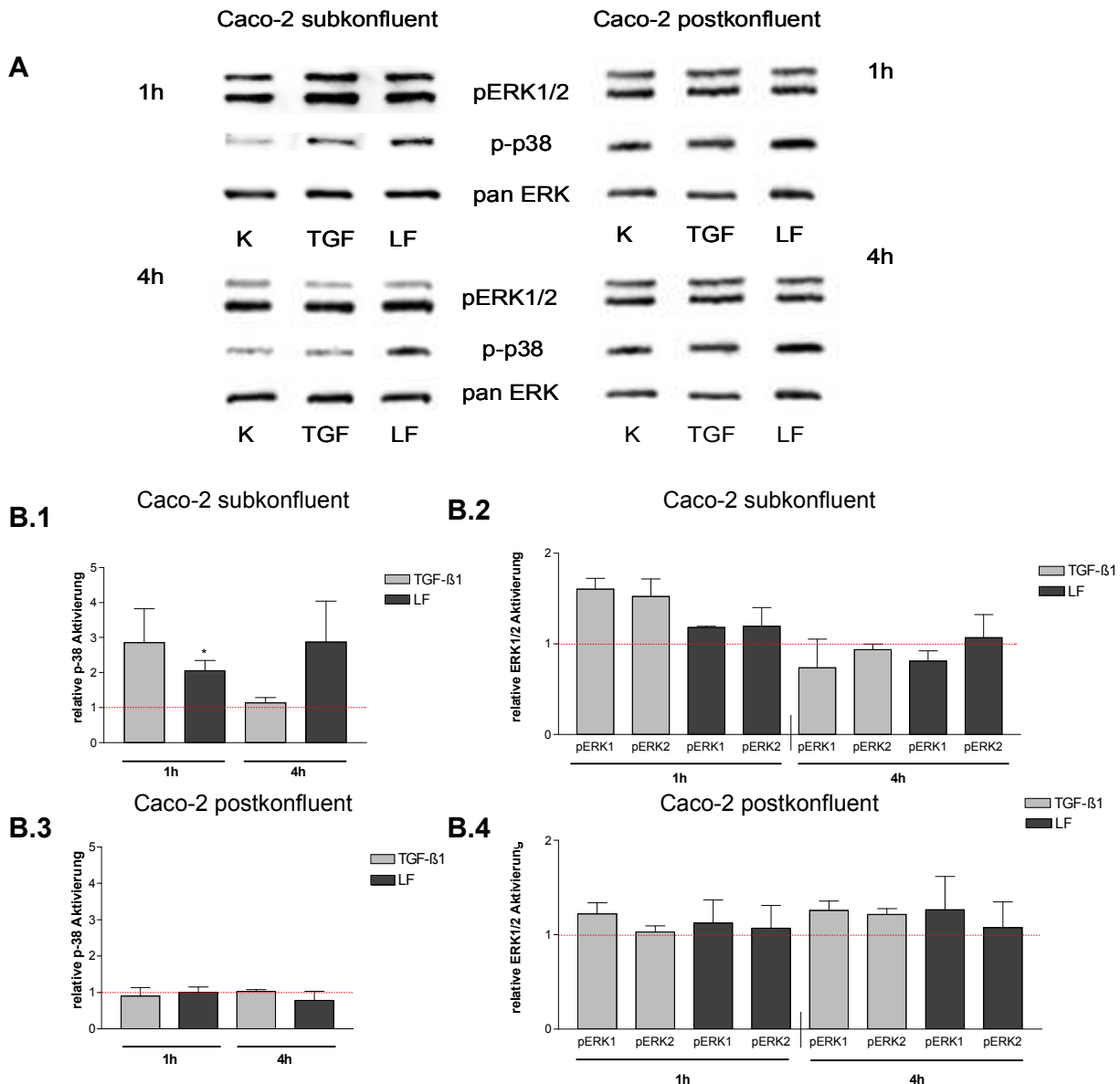


Abbildung 26: Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivierung der MAPKinasen p38, ERK1 und ERK2 in subkonfluenten und postkonfluenten Caco-2 Zellen.

A: Repräsentative Abbildungen der Western Blot Signale von p-p38, pERK1 und pERK2 nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml) in sub- und postkonfluenten Caco-2 Zellen. Als Ladekontrolle wurde pan ERK verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen p38 (**B.1**;**B.3**)- und pERK1/2 (**B.2**;**B.4**)-Aktivierung in subkonfluenten (**B.1**;**B.2**) und postkonfluenten (**B.3**;**B.4**) Caco-2 Zellen. Mittelwerte (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-test (*: $p < 0,05$).

Abbildung 26 zeigt im subkonfluenten Stadium nach einer Stunde eine beinahe dreifache Stimulierung von p38 durch TGF- β 1, die jedoch nach vierstündiger Inkubation auf das Kontrollniveau zurückfällt, während die Laktoferrin-induzierte p38-Aktivierung nach vier Stunden vom Zweifachen auf beinahe das Dreifache

ansteigt. Im Gegensatz dazu hat weder TGF- β 1 noch Laktoferrin bei postkonfluenten Zellen einen Effekt auf die p38-Aktivierung zur Folge. Abgesehen von einer Stimulierung um etwa 60 % durch TGF- β 1 nach einer Stunde bei subkonfluenten Caco-2 Zellen bleiben die p-ERK1/2-Level von TGF- β 1 und Laktoferrin unbeeinflusst und auch unabhängig vom Differenzierungsgrad unverändert.

Um der Unresponsiveness gegenüber TGF- β 1 und Laktoferrin im Verlauf der Differenzierung von Caco2-Zellen auf den Grund zu gehen, wurden LRP-1, β -Catenin und Dab2 als Schlüsselkomponenten im Crosstalk verschiedener Signalwege auf Proteinebene analysiert.

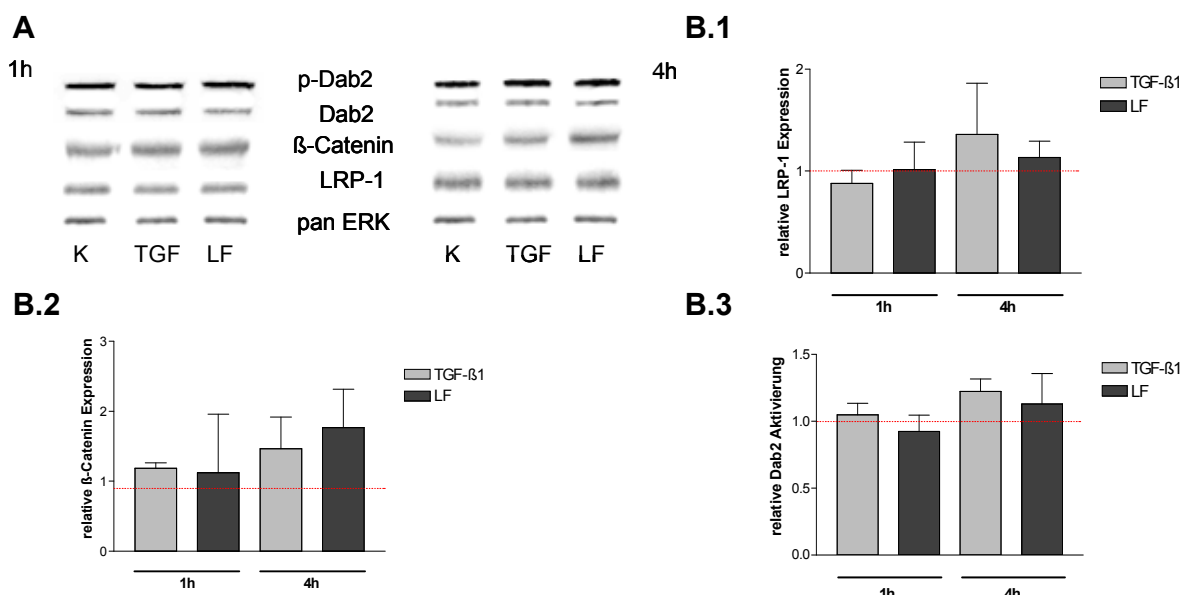


Abbildung 27: Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Expression von LRP-1, β -Catenin und p-Dab2 in postkonfluenten Caco-2 Zellen.

A: Repräsentative Abbildungen der Western Blot Signale von LRP-1, β -Catenin und p-Dab2 nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml). Als Ladekontrolle wurde pan ERK verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen LRP-1(**B.1**)-, β -Catenin (**B.2**)-Expression und Dab2 (**B.3**) –Aktivierung in postkonfluenten Caco-2 Zellen. Mittelwerte (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-sample-t-test (*: $p < 0,05$).

Die Expression von LRP-1 und p-Dab2 bleibt nach einer und vier Stunden Inkubation mit TGF- β 1 und Laktoferrin unverändert auf dem Niveau der Kontrolle, während β -Catenin nach vier Stunden durch TGF- β 1 um etwa 50 % und durch Laktoferrin um beinahe 80 % stimuliert wird.

4.2.1 Einfluss von bovinem Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Signaltransduktion und die Proteinexpression in subkonfluenten Caco-2 Zellen

Da Laktoferrin in der Konzentration von 50 μ g/ml in subkonfluenten Caco-2 Zellen vielfach zu vergleichbaren, jedoch deutlich schwächeren Effekten wie TGF- β 1 selbst führt, wurden in nachfolgendem Konzentrationsverlauf dosisabhängige Effekte von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf Proteinebene untersucht.

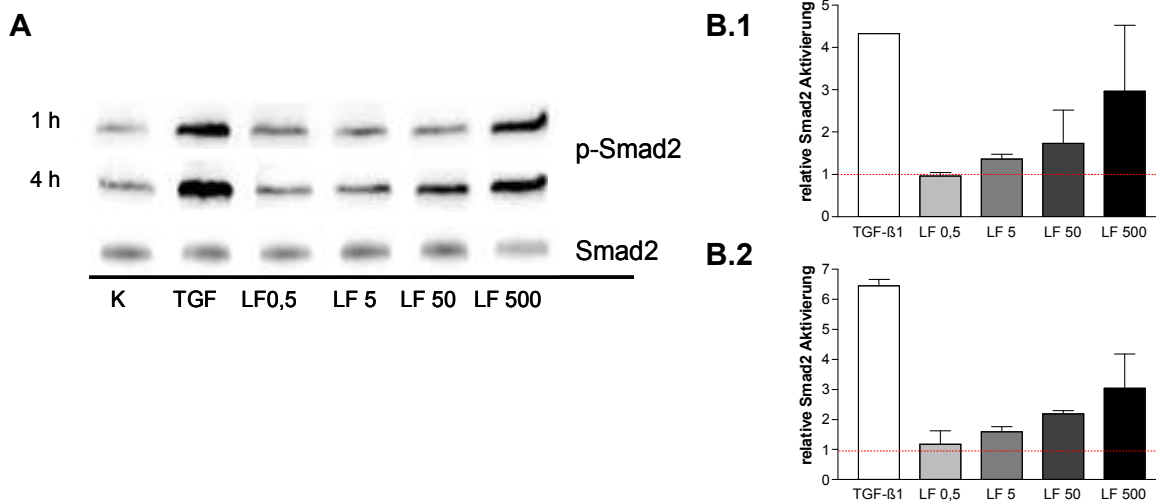


Abbildung 28: Effekt von Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Aktivierung von Smad2 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.

A: Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von p-Smad2 nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (0,5, 5, 50 und 500 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml).

Als Ladekontrolle wurde Smad2 verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen Smad2-Phosphorylierung nach 1 (**B.1**)- und 4 (**B.2**)-stündiger Inkubation. Mittelwerte (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 28 zeigt sowohl nach ein- als auch nach vierstündiger Inkubation mit Laktoferrin einen dosisabhängigen Anstieg der p-Smad2-Aktivierung, der maximal eine dreifache Stimulierung bei der Konzentration von 500 μ g/ml erreicht, die im Vergleich zu TGF- β 1 nach einer Stunde auf etwa gleichem Niveau, jedoch nach vier Stunden etwas geringer ist.

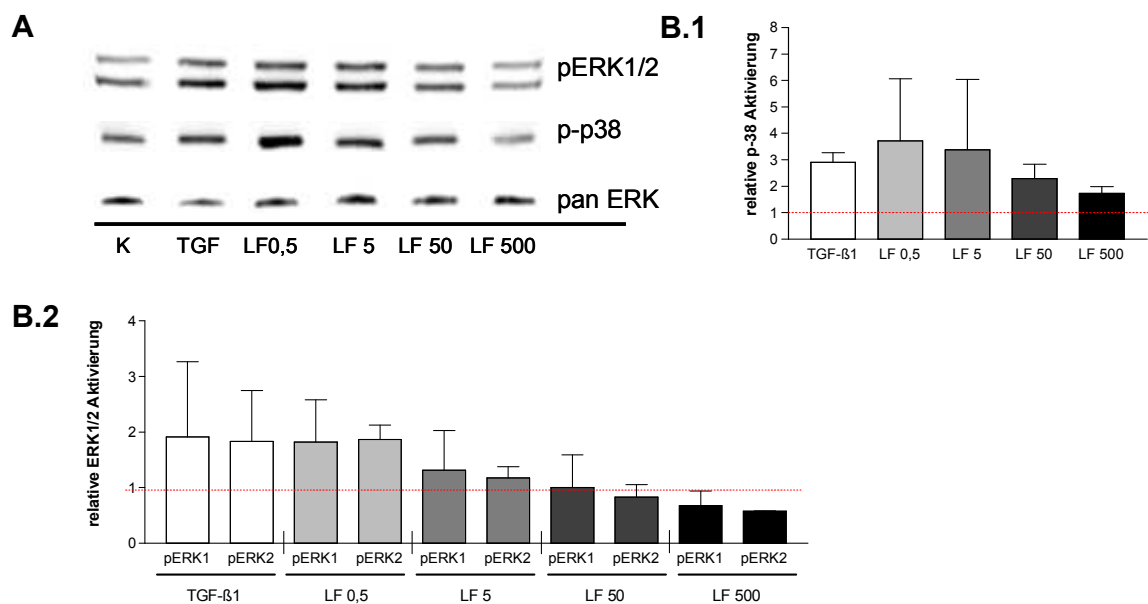


Abbildung 29: Effekt von Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF-β1 auf die Aktivierung der MAPKinasen p38, ERK1 und ERK2 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.

A: Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von p38 und pERK1/2 nach 1-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (0,5, 5, 50 und 500 µg/ml) und TGF-β1 (1ng/ml). Als Ladekontrolle wurde pan ERK verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen p38 (**B.1**)- und pERK1/2 (**B.2**)-Aktivierung. Mittelwerte (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten.

Im Unterschied zur Smad-2-Aktivierung sinkt die Stimulierung der MAPKinasen p38 und ERK1/2 nach einstündiger Inkubation mit ansteigender Konzentration von Laktoferrin.

Im Vergleich zu TGF-β1, das nach einer Stunde zu einer beinahe dreifachen p38-Aktivierung führt, ist ein deutlich erhöhter Effekt durch die niedrigsten eingesetzten Laktoferrin-Dosen in Abbildung 29 (B.1) zu beobachten. Während Laktoferrin ab einer Konzentration von 50 µg/ml nach einer Stunde im Vergleich zu TGF-β1 einen schwächeren Effekt auf p38 hat, führen die niedrigsten eingesetzten Laktoferrin-Dosen zu einer deutlich erhöhten p38-Aktivierung auf mehr als das Dreifache.

In Abbildung 29 (B.2) ist erkennbar, dass Laktoferrin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eine beinahe zweifache und damit mit TGF-β1 vergleichbare Stimulierung von ERK1/2 induziert, die jedoch bei Dosiserhöhung bis unter das Niveau der Kontrolle sinkt.

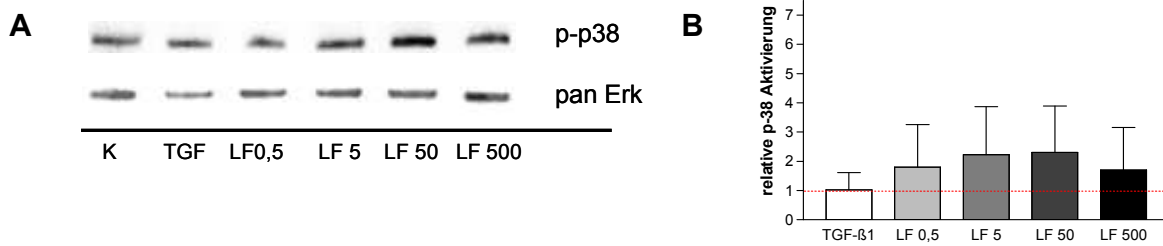


Abbildung 30: Effekt von Laktotferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF-β1 auf die Aktivierung der MAPKinase p38 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.

A: Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von p38 nach 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktotferrin (0,5, 5, 50 und 500 µg/ml) und TGF-β1 (1 ng/ml). Als Ladekontrolle wurde pan ERK verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen p38-Aktivierung. Mittelwerte (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten.

Nach vierstündiger Inkubation ist keine Stimulierung von p38 durch TGF-β1 erkennbar. Während Laktotferrin bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml p38 zunehmend aktiviert, lässt eine weitere Dosiserhöhung auf das Zehnfache den p38-Aktivierungszustand auf den Wert von 0,5 µg/ml sinken.

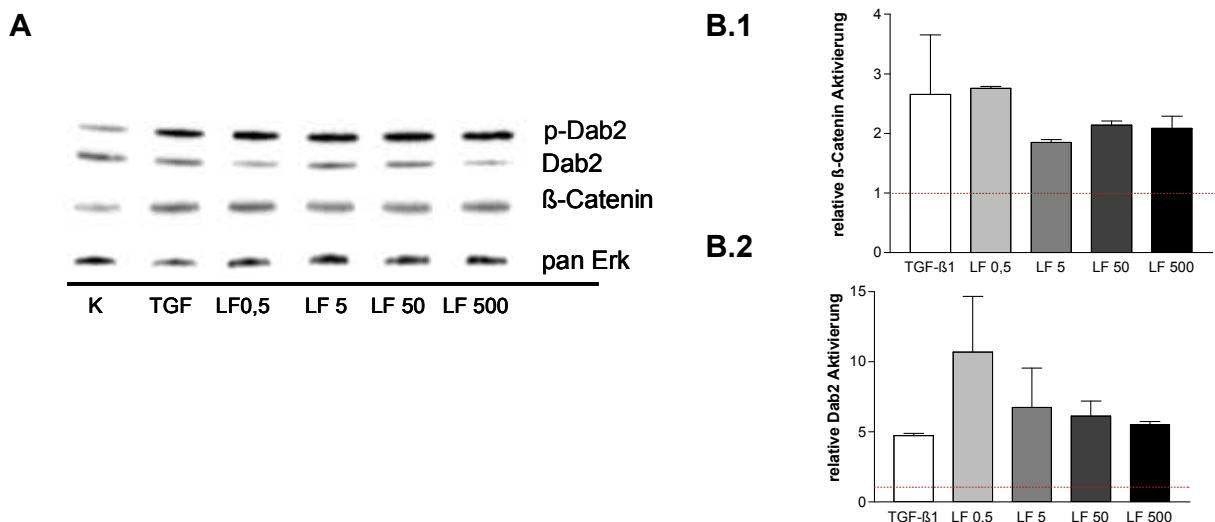


Abbildung 31: Einfluss von Laktotferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF-β1 auf die Expression von β-Catenin und p-Dab2 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.

A: Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von β-Catenin und p-Dab2 nach 1-stündiger Inkubation mit bovinem Laktotferrin (0,5, 5, 50 und 500 µg/ml) und TGF-β1 (1ng/ml). Als Ladekontrolle wurde pan ERK verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen β-Catenin (**B.1**)- und p-Dab2 (**B.2**)-Expression. Mittelwerte (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten.

β-Catenin wird nach einer Stunde Inkubation mit 0,5 µg /ml Laktotferrin auf mehr als das Zweifache und somit vergleichbar stark hinaufreguliert wie durch TGF-β1 selbst, wohingegen das Niveau der Stimulierung durch Erhöhung der

eingesetzten Dosis deutlich sinkt. Dab2 wird durch 0,5 µg/ml Laktoferrin mehr als doppelt so stark stimuliert wie durch TGF-β1, welches eine relative Aktivierung auf das Fünffache der Kontrolle induziert. Mit steigender Laktoferrin-Konzentration wird die p-Dab2-Signalstärke schwächer, bleibt aber dennoch stets über dem Niveau von TGF-β1.

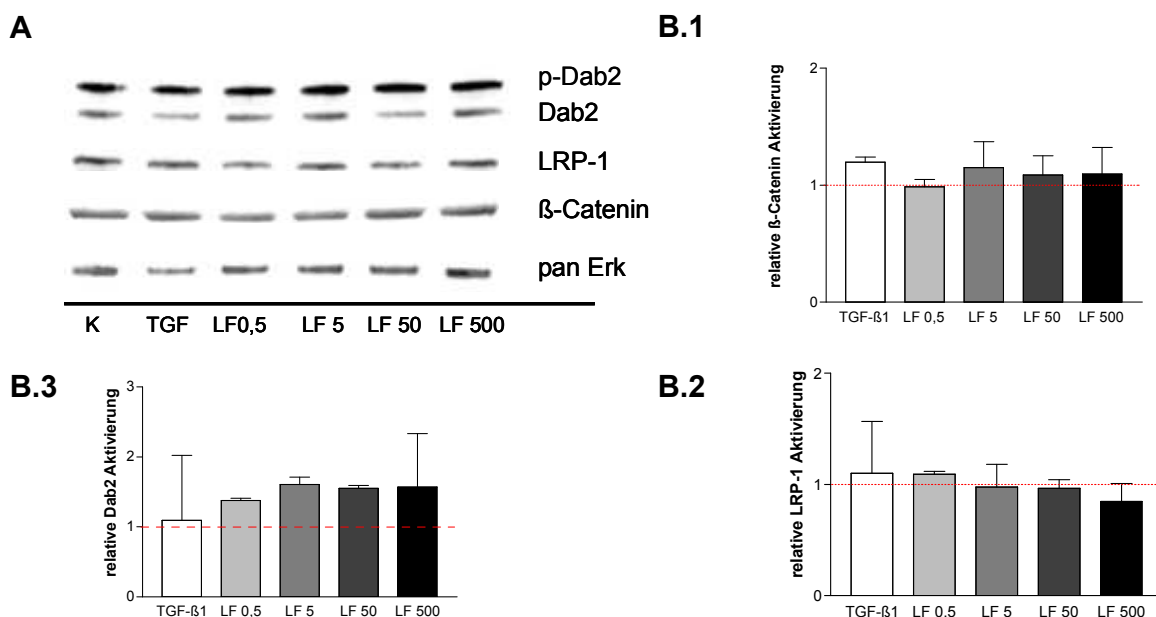


Abbildung 32: Einfluss von Laktoferrin in ansteigender Konzentration im Vergleich zu TGF-β1 auf die Expression von β-Catenin, LRP-1 und p-Dab2 in subkonfluenten Caco-2 Zellen.

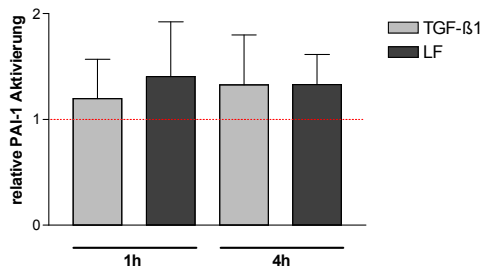
A: Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von β-Catenin, LRP-1 und p-Dab2 nach 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (0,5, 5, 50 und 500 µg/ml) und TGF-β1 (1ng/ml). Als Ladekontrolle wurde pan ERK verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen β-Catenin (**B.1**)-, LRP-1 (**B.2**) –Expression und Dab2 (**B.3**)-Aktivierung. Mittelwerte (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten.

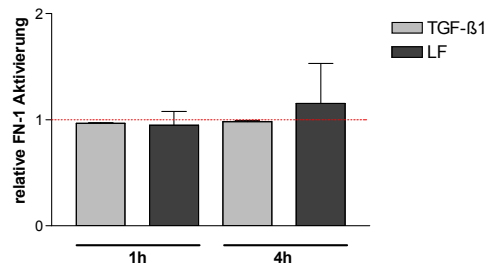
Nach vierstündiger Inkubation ist abgesehen von einer schwachen Dab2-Aktivierung um etwa 50 % durch alle eingesetzten Konzentrationen von Laktoferrin kein Effekt weder von TGF-β1 noch von Laktoferrin auf β-Catenin oder LRP-1 zu beobachten.

4.2.2 Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression ausgewählter Gene in postkonfluenten Caco-2 Zellen

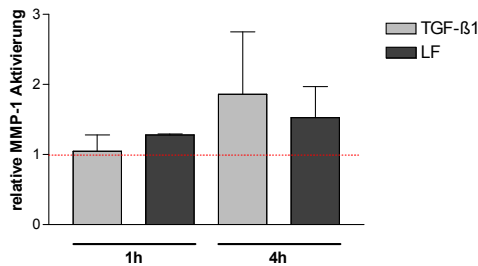
A.1



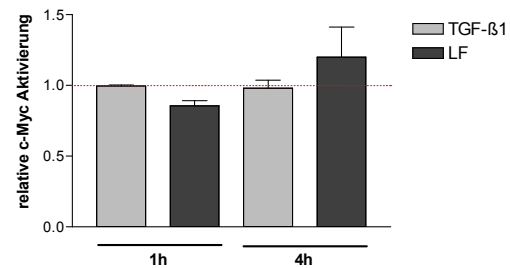
A.2



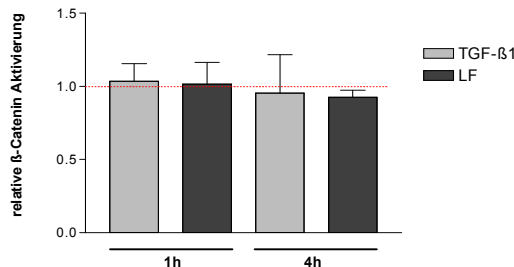
A.3



A.4



A.5



A.6

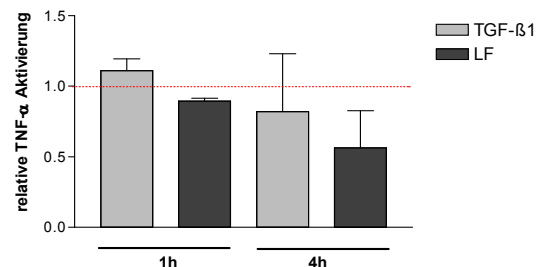


Abbildung 33: Einfluss von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von PAI-1, FN-1, MMP-1, c-Myc, β -Catenin und TNF- α in postkonfluenten Caco-2 Zellen.

B: Grafische Darstellung der relativen PAI-1(A.1)-, FN-1(A.2)-, MMP-1(A.3)-, c-Myc(A.4)-, β -Catenin(A.5)- und TNF- α (A.6)-Stimulierung nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml). Mittelwerte (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils im Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf das Housekeeping-Gen normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western Blot-Analysen können auf transkriptioneller Ebene in postkonfluenten Caco-2-Zellen nach ein- und vierstündiger Inkubation keine signifikanten Veränderungen in der Expression typischer Zielgene durch TGF- β 1 und Laktoferrin nachgewiesen werden.

4.3 Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Signaltransduktion in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen

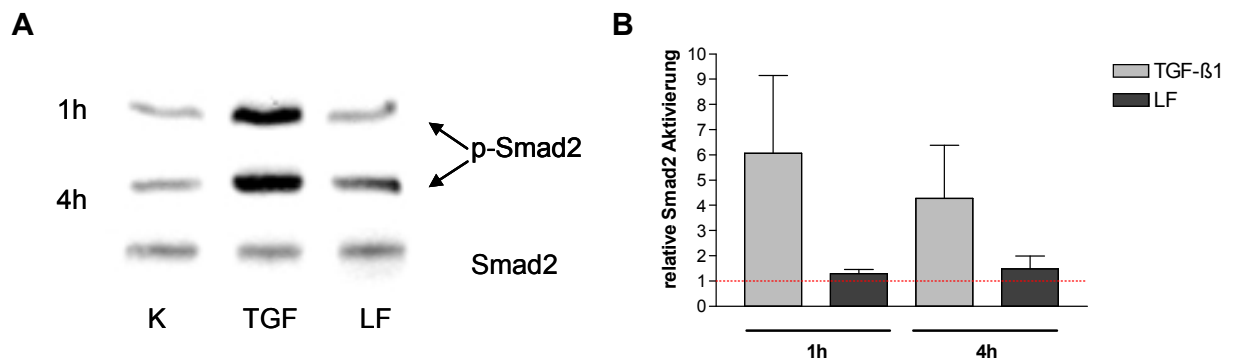


Abbildung 34: Effekt von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Smad2-Aktivierung in differenzierten THP-1 Zellen.

A: Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von p-Smad2 nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml). Als Ladekontrolle wurde Smad2 verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen Smad2-Aktivierung in differenzierten THP-1 Zellen. Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen, jeweils im Duplikat durchgeführten Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Differenzierungsverlaufes kann p-Smad2 nur in differenzierten THP-1 Zellen detektiert werden. Im Gegensatz zu Caco-2 Zellen ist die TGF- β 1-induzierte Aktivierung von Smad2 auf das Sechsfache nach einer Stunde ausgeprägter als nach vier Stunden, wohingegen Laktoferrin nach ein- und vierstündiger Inkubation zu keiner bzw. nur zu einer schwachen Aktivierung von Smad2 von beinahe 50 % führt.

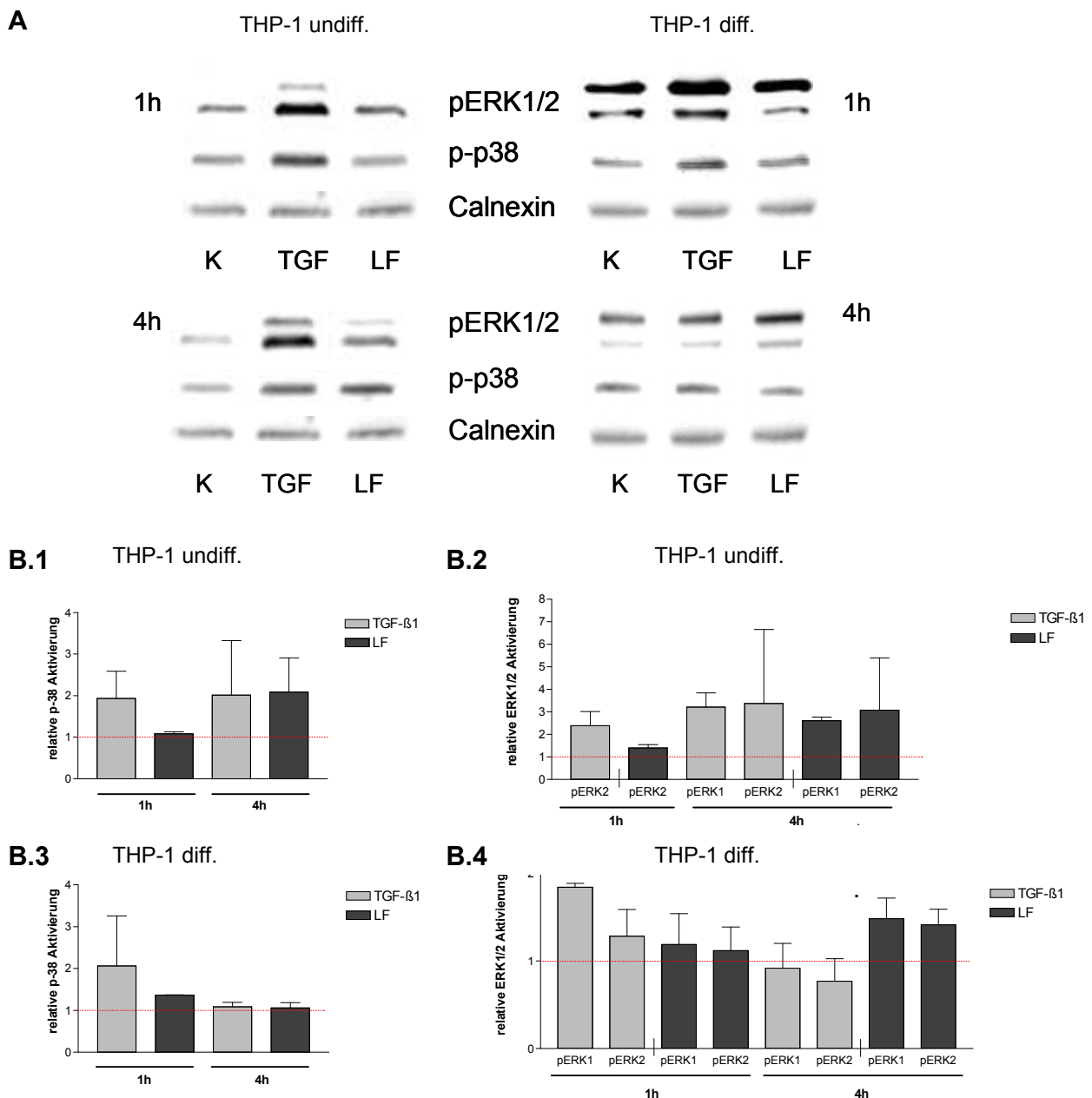


Abbildung 35: Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivierung der MAPKinasen p38, ERK1 und ERK2 in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen.

A: Repräsentative Abbildungen der Western Blot Signale von p-p38, pERK1 und pERK2 nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml). Als Ladekontrolle wurde Calnexin verwendet.

B: Grafische Darstellung der relativen p38 (**B.1**;**B.3**)- und pERK1/2 (**B.2**;**B.4**)-Aktivierung in undifferenzierten (**B.1**;**B.2**) und differenzierten (**B.3**;**B.4**) THP-1 Zellen. Mittelwerte (+/- SD) von zwei unabhängigen jeweils im Duplikat durchgeführten Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt.

p38 wird nach einstündiger Inkubation mit TGF- β 1 in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen auf das Zweifache hinaufreguliert, während Laktoferrin keine Effekte auf diese MAPKinase zeigt. Nach vier Stunden wird

die relative p38-Aktivierung in monozytären THP-1 Zellen durch Laktoferrin ebenso wie durch TGF- β 1 verdoppelt, wohingegen in ausdifferenzierten Zellen weder ein Effekt durch TGF- β 1 noch durch Laktoferrin zu beobachten ist. pERK2 wird in THP-1 Monozyten ebenso wie pERK1 in differenzierten Zellen nach einstündiger Inkubation durch TGF- β 1, jedoch nicht durch Laktoferrin, auf das Zweifache stimuliert. Da pERK1 in undifferenzierten THP-1 Zellen nur schwach bzw. nicht detektierbar war, konnte keine statistische Auswertung erfolgen. Nach vierstündiger Inkubation steigt das Niveau der ERK1/2-Aktivierung in undifferenzierten THP-1 Zellen sowohl durch TGF- β 1 als auch durch Laktoferrin auf etwa das Dreifache an. Dagegen sinken die pERK1/2-Level in THP-1 Makrophagen durch TGF- β 1 auf bzw. knapp unter das Kontrollniveau, während Laktoferrin nur eine Stimulierung von etwa 40 % induziert.

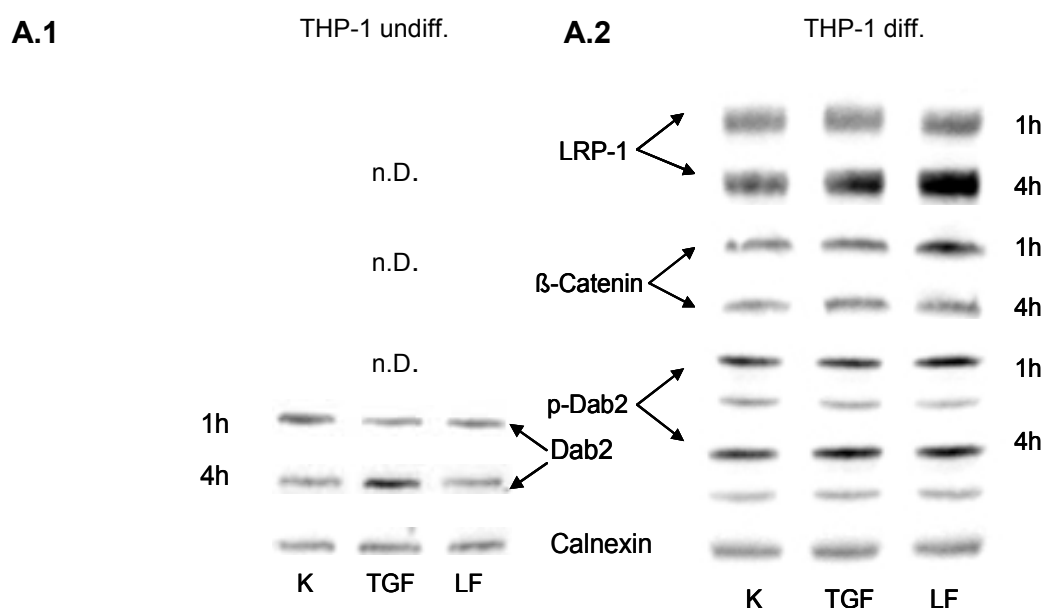


Abbildung 36: Repräsentative Abbildung der Dab2-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen (**A.1**) und der p-Dab2-, β -Catenin- und LRP-1-Expression in differenzierten THP-1 Zellen (**A.2**) nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml).

Wie bereits die Ergebnisse im Differenzierungsverlauf zeigten, werden p-Dab2, β -Catenin und LRP-1 in undifferenzierten THP-1 Zellen nicht exprimiert, wodurch die Abbildungen entsprechender Signale fehlen.

In THP-1 Makrophagen wird β -Catenin nach einer Stunde durch Laktoferrin um etwa 60 % hinaufreguliert, während bei LRP-1 erst nach vier Stunden ein

schwacher Effekt von TGF- β 1 sowie eine zweifache Stimulierung durch Laktoferrin erkennbar ist. Ebenso ist auch p-Dab2 erst in differenzierten Zellen nachweisbar, bleibt jedoch von TGF- β 1 und Laktoferrin unbeeinflusst auf Kontrollniveau. Dies sind allerdings nur vorläufige Ergebnisse, die erst durch weitere Experimente bestätigt werden müssen.

4.3.1 Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von PAI-1 in undifferenzierten THP-1 Zellen

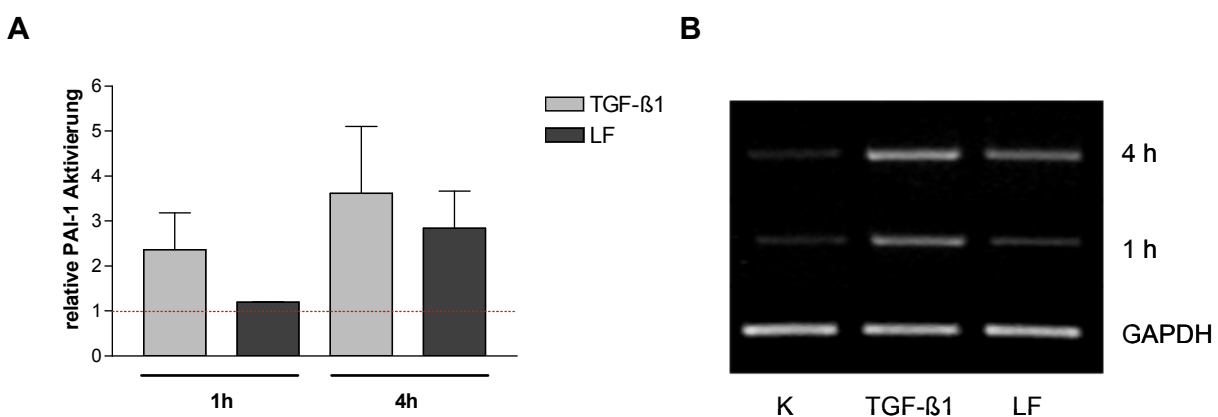


Abbildung 37: Effekt von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von PAI-1 in undifferenzierten THP-1 Zellen.

A: Grafische Darstellung der relativen PAI-1-Stimulierung. Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen jeweils im Duplikat durchgeführten Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf das Housekeeping-Gen normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt.

B: Repräsentative Abbildung der PAI-Aktivierung nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml).

In Korrelation mit den Westen Blot Ergebnissen von p-p38 und pERK1/2 ist auf RNA-Ebene bei PAI-1 nach einer Stunde nur ein Effekt von TGF- β 1 und nach vier Stunden sowohl von TGF- β 1 als auch von Laktoferrin erkennbar.

Die PAI-Expression wird in undifferenzierten THP-1 Zellen nach einstündiger Inkubation mit TGF- β 1 auf mehr als das Doppelte stimuliert und steigt nach vier Stunden auf beinahe das Vierfache des Kontrollwertes an. Laktoferrin aktiviert PAI-1 erst nach vier Stunden und verglichen mit TGF- β 1 in etwas geringerem Ausmaß.

4.3.2 Einfluss von bovinem Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression ausgewählter Zielgene in differenzierten THP-1 Zellen

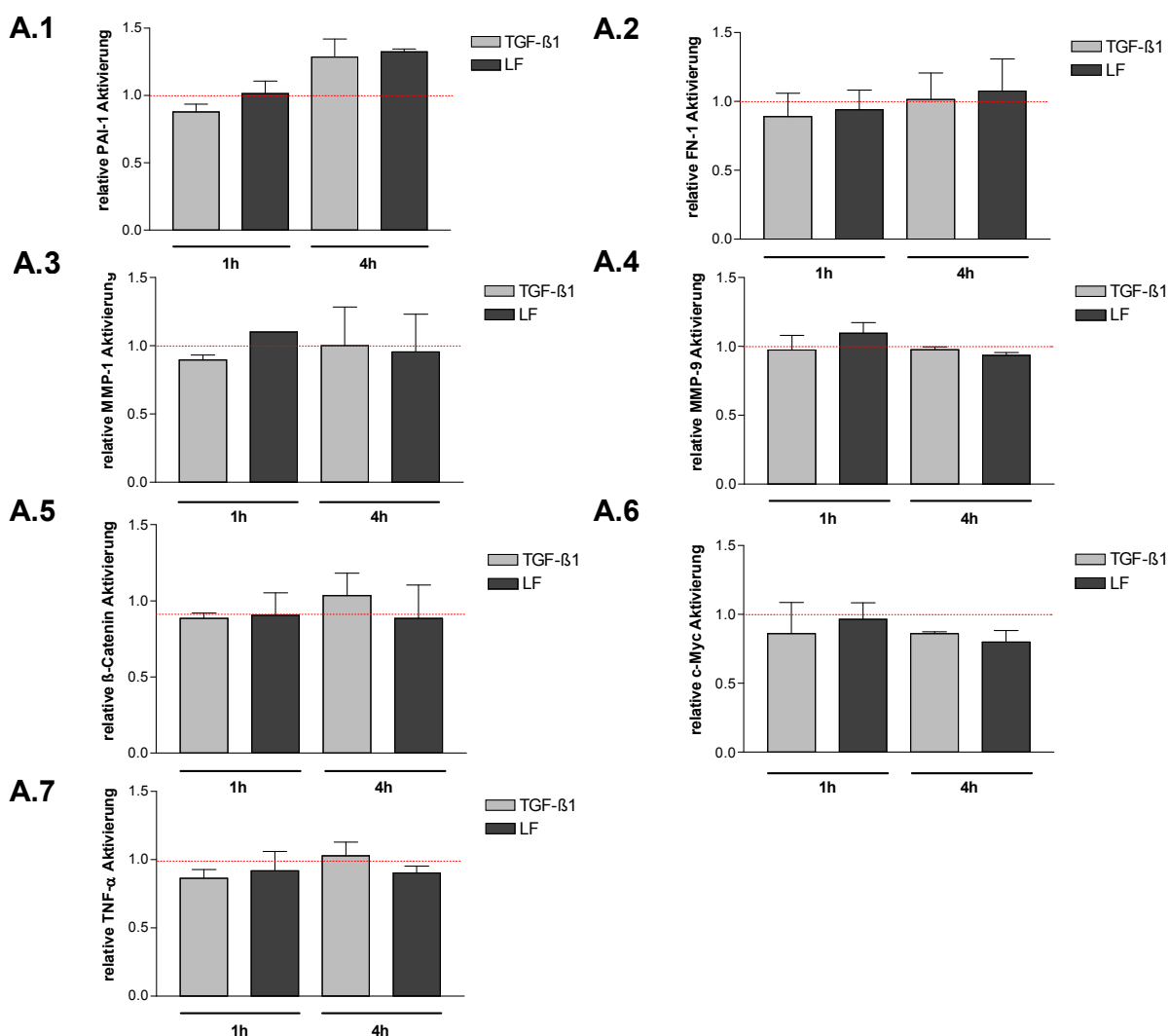


Abbildung 38: Einfluss von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die Expression von PAI-1, FN-1, MMP-1, MMP-9, c-Myc, β -Catenin und TNF- α in postkonfluenten THP-1 Zellen.

B: Grafische Darstellung der relativen PAI-1(A.1)-, FN-1(A.2)-, MMP-1(A.3)-, MMP-9(A.4)-, c-Myc(A.5)-, β -Catenin(A.6)- und TNF- α (A.7)-Stimulierung nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml). Mittelwerte (+/- SD) von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils im Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt.

Wie Abbildung 38 zeigt, ist bei differenzierten THP-1 Zellen weder nach einer noch nach vier Stunden Inkubation eine Aktivierung der untersuchten Zielgene durch TGF- β 1 oder Laktoferrin zu beobachten.

5 DISKUSSION

Regulation der Expression ausgewählter Proteine und Gene in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades von Caco-2 Zellen

Die Ergebnisse des Caco-2 Zellvergleichs reflektieren insgesamt den Übergang von vereinzelter, subkonfluenten Caco-2 Zellen zu einem geschlossenen, polarisierten Epithel, welches durch Ausbildung verschiedener Adhäsionskomplexe für den Zell-Zellverband sowie durch Interaktionen mit Komponenten der EZM charakterisiert ist. Gleichzeitig kann eine modulierte Regulierung beteiligter Zielgene, Rezeptoren und nachgeschalteter Signalmoleküle beobachtet werden [HALBLEIB et al., 2007].

PCR-Analysen von Genen, die maßgeblich an der Zelladhäsion, -migration und -invasion sowie dem Umsatz und der Homöostase von Geweben beteiligt sind [DENG, 2001; CHAKRABORTI et al., 2003], zeigen zum Beispiel bei PAI-1 eine statistisch signifikante Reduktion um etwa 50 % in postkonfluenten Caco-2 Zellen, während MMP-1 verstärkt exprimiert wird. Dadurch könnte die Aktivität matrixabbauender Enzyme sowie die Degradation der EZM begünstigt und damit morphologische Veränderungen im Zuge der Differenzierung forciert werden [MASSAGUE et al., 2000]. In Übereinstimmung mit den Ergebnisse von Salmela et al., kann in Caco-2 Zellen keine Expression der Gelatinase MMP-9 nachgewiesen werden [SALMELA et al., 2004].

Ein Expressionsanstieg der Sucrase-Isomaltase gilt als funktioneller Parameter der Caco-2 Zelldifferenzierung [CHANTRET et al., 1988; MARIADASON et al., 2000]. Dieser konnte auch hier auf transkriptioneller Ebene in postkonfluenten Caco-2 Zellen statistisch signifikant nachgewiesen werden.

Als weiteres Charakteristikum der Caco-2-Differenzierung wird in der Literatur ein spontaner Stillstand des Zellzyklus beschrieben, wobei die Zellen in der G₀/G₁-Phase akkumulieren, ohne dabei der Apoptose zu unterliegen [HARA et al., 1993; MARIADASON et al., 2000]. Die Ergebnisse der durchgeführten PCR-Analysen zeigen eine transkriptionelle Down-Regulierung des Proto-Onkogens c-Myc im Zuge des Caco-2 Differenzierungsprozesses.

Nach Roussel et al. verhindert eine reduzierte c-Myc-Expression den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus. [ROUSSEL et al., 1991].

Zudem nimmt die Fähigkeit Smad2 zu aktivieren im differenzierten Stadium deutlich ab bzw. geht gänzlich verloren. Die Ergebnisse des Zellvergleichs bestätigen ebenso wie jene ein- und vierstündiger Inkubationen mit bLF und TGF- β 1, die in der Literatur beschriebene, sich entwickelnde TGF- β 1-Unresponsiveness differenzierter Caco-2 Zellen [NICOLÁS und HILL, 2003, JAKOWLEW, 2006]. Diese stimmen auch mit zuvor durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen überein, die im Gegensatz zu postkonfluenten Caco-2 Zellen nur im subkonfluenten Stadium eine deutliche Smad2-Akkumulierung im Zellkern durch TGF- β 1 und in etwas schwächerem Ausmaß auch durch Laktoferrin nachweisen konnten [HAMMERSCHMID, 2008].

Dass Smad2 innerhalb einer Stunde nach Stimulierung durch TGF- β 1 aktiviert wird [MASSAGUÉ und WOTTON, 2000], zeigen auch die Ergebnisse der Western Blot Analysen in subkonfluenten Caco-2 Zellen. Dabei ist bereits nach einer Stunde eine dramatische Stimulierung von Smad2 durch TGF- β 1 und auch in geringerem Ausmaß durch Laktoferrin erkennbar. Dieser Effekt wird nach Verzehnfachung der eingesetzten Laktoferrin-Konzentration auf 500 μ g/ml vor allem nach einer, aber auch nach vier Stunden noch gesteigert.

In der Literatur werden im Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung bzw. dem Verlust der TGF- β 1-abhängigen Signalvermittlung unter anderem auch Mutationen im Bereich des TGF- β -Rezeptorsystems diskutiert [KIM et al, 2000; MASSAGUÉ et al., 2000; AKHURST und DERYNCK, 2001].

PCR-Analysen konnten auf RNA-Ebene in beiden Differenzierungsstadien, mit Ausnahme von β -Glycan, keine Expressionsveränderungen der beteiligten Rezeptoren feststellen. Dennoch können funktionelle Rezeptorstörungen nicht ausgeschlossen werden. β -Glycan gilt in der Literatur als Positivregulator TGF- β 1-induzierter Signale [LETAMENDÍA et al., 1998]. Der auf transkriptioneller Ebene festgestellte Anstieg der β -Glycan-Expression sollte daher die Antwortfähigkeit auf TGF- β 1 erhöhen und steht im Widerspruch zum zuvor beschriebenen Verlust der TGF- β 1-Responsivität.

Die Smad-abhängige Signaltransduktion wird auch durch den Crosstalk mit anderen Signalwegen über verschiedene Mechanismen moduliert, beispielsweise über den MAPK-Pathway. Dieser kann auch durch bLF und TGF- β 1 direkt aktiviert werden [HOCEVAR et al., 1999; ENGEL et al., 1999; HARTSOUGH und MULDER, 1995].

Im Zellvergleich ist bei den MAPKinasen p38 und pERK1/2 ein statistisch höchst signifikanter Abfall der Grundlevel auf weniger als ein Drittel im Vergleich zu undifferenzierten Caco-2 Zellen erkennbar. Auch nach ein- und vierstündiger Inkubation mit TGF- β 1 und bLF konnte in differenzierten Caco-2 Zellen kein Effekt nachgewiesen werden. Dagegen zeigen Caco-2 Zellen im subkonfluenten Stadium nach einer Stunde mit einer beinahe dreifachen bzw. einer statistisch signifikanten Verdoppelung der p38-Aktivierung eine deutliche Reaktion auf TGF- β 1 bzw. bLF. Den Ergebnissen zufolge wird p38 durch Laktoferrin zeit- und konzentrationsabhängig stimuliert. Dabei erreicht der Aktivierungszustand von p38 durch Laktoferrin in einer Konzentration von 50 μ g/ml nach vier Stunden das Niveau von TGF- β 1 und übersteigt bereits nach einer Stunde in niedrigeren Dosen von 0,5 μ g/ml sowie 5 μ g/ml den Effekt von TGF- β 1. Im Gegensatz zu differenzierten Caco-2 Zellen wird die Stimulierung von ERK1/2 nach einstündiger Inkubation durch TGF- β 1 ebenso wie durch 0,5 μ g/ml Laktoferrin beinahe verdoppelt.

LRP-1 ist ein Rezeptor, der dafür bekannt ist, MAPKinasen in Antwort auf Laktoferrin zu aktivieren [GREY et al., 2004]. Der dramatische Anstieg der Grundexpression von LRP-1 liefert jedoch ebenso wenig wie die dreifache Stimulierung des Adapterproteins Dab1 eine Erklärung für die Resistenz differenzierter Caco-2 Zellen gegenüber Laktoferrin.

Die defiziente Aktivierung von Smad2 im differenzierten Stadium kann möglicherweise mit der signifikanten Reduktion von p-Dab2 um mehr als zwei Drittel auf Proteinebene in Verbindung gebracht werden. Da Dab2 als Adapterprotein im TGF- β -Pathway an der Signalvermittlung zwischen dem TGF- β -Rezeptorkomplex und Smad2/3 beteiligt ist, wird eine Inaktivierung oder Down-Regulation von Dab2 im Differenzierungsverlauf als möglicher

Mechanismus im Zusammenhang mit dem Verlust der TGF- β 1-Responsivität verschiedener Krebszellarten diskutiert [HOCEVAR et al., 2001].

Nach den Ergebnissen der Western Blot-Analysen zeigt weder TGF- β 1 noch bLF nach ein- und vierstündiger Inkubation in postkonfluenten Zellen einen Effekt auf p-Dab2. Dagegen reagieren subkonfluente Caco-2 Zellen auf TGF- β 1 bereits nach einer Stunde mit einem fünffachen Anstieg der p-Dab2-Level. Laktoferrin induziert in einer Dosis von 0,5 μ g/ml eine doppelt so starke Dab2-Aktivierung und zeigt in allen anderen eingesetzten Konzentrationen einen gegenüber TGF- β 1 deutlich erhöhten Effekt. Nach vier Stunden sinkt der Aktivierungszustand von Dab2 jedoch wieder beinahe auf Kontrollniveau zurück.

In Epithelzellen könnte auch die Akkumulation von zytoplasmatischem β -Catenin für die verminderte bzw. fehlende TGF- β 1-Responsivität verantwortlich gemacht werden. Dabei könnte β -Catenin durch vermehrte Interaktion mit R-Smads die TGF- β -induzierte Signalvermittlung beeinträchtigen [MARIADASON et al., 2001; NISHITA et al., 2000; ZHANG et al., 2007].

Entgegen dem in der Literatur beschriebenen Anstieg der (Gesamt-)Proteinlevel von β -Catenin im Verlauf der Caco-2 Zelldifferenzierung [MARIADASON et al., 2001] wurde hier kein Unterschied auf Proteinebene nachgewiesen. Ebenso wenig konnte auf transkriptioneller Ebene weder bei β -Catenin noch bei dem Co-Rezeptor LRP-5 Expressionsveränderungen festgestellt werden.

In subkonfluenten Caco-2 Zellen steigen die Proteinlevel von β -Catenin nach einstündiger Inkubation durch TGF- β 1 sowie durch bLF in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml gleichermaßen auf mehr als das Doppelte. Diese fallen jedoch durch Erhöhung der Laktoferrindosis deutlich, sowie nach einer Inkubationszeit von vier Stunden auf Kontrollniveau zurück. Postkonfluente Zellen reagieren erst nach vier Stunden und mit einem 50%igem bzw. 80%igem Anstieg auch in deutlich geringerem Ausmaß auf TGF- β 1 und bLF.

Auf transkriptioneller Ebene können in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Signaltransduktions-Analysen nach ein- und vierstündiger Inkubation in

postkonfluenten Caco-2-Zellen keine Veränderungen in der Expression typischer Zielgene durch TGF- β 1 und Laktoferrin nachgewiesen werden.

In der Literatur ist TGF- β 1 dafür bekannt, durch die Downregulierung von c-Myc das Wachstum epithelialer Zellen zu hemmen [HANNON und BEACH, 1994; DATTO et al., 1995]. PCR-Analysen konnten hingegen nach ein- und vierstündiger Inkubation mit TGF- β 1 und bLF keine verminderte Expression von c-Myc nachweisen. Der Verlust der Fähigkeit die c-Myc-Expression in Antwort auf TGF- β 1 zu hemmen, wurde bereits in einer Brustkrebszelllinie bei Chen et al. als Indikator im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber TGF- β 1-vermittelten Effekten diskutiert [CHEN et al., 2001].

Zudem konnte auf RNA-Ebene auch keine Stimulierung von PAI-1, einem klassischen TGF- β 1-Zielgen, nachgewiesen werden. Da PAI-1 als Maß für die Antwortfähigkeit der Zellen auf TGF- β 1 gilt [CHEN, 2007], könnte die fehlende PAI-1 Aktivierung ein weiterer Hinweis für den Reaktionsverlust postkonfluenter Caco-2 Zellen auf TGF- β 1 sein.

Aus der Literatur ist bekannt, dass MMP-1 in konfluenten Caco-2 Zellen durch TGF- β 1 und in HeLa bzw. H-hLf6 Zellen durch Laktoferrin auf RNA-Ebene hinaufreguliert wird [SALMELA et al., 2004; OH et al., 2001].

Dagegen konnten PCR-Analysen nur eine schwache Stimulierung von MMP-1 nachweisen. Diese könnte durch den abweichenden Differenzierungsgrad der verwendeten Caco-2 Zellen bedingt sein [ENGLE et al., 1998].

Zudem konnte nach vierstündiger Inkubation eine Laktoferrin-abhängige Reduktion der TNF- α -Expression um etwa 50 % festgestellt werden. Dieses Ergebnis könnte möglicherweise die in der Literatur beschriebene Hypothese unterstützen, wonach Laktoferrin als Suppressor inflammatorischer Zytokine wie TNF- α gilt [MACHNICKI et al., 1993; HAVERSEN et al., 2002].

Regulation der Expression ausgewählter Zielproteine und -gene in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades von THP-1 Zellen

Die Expressionsmuster von THP-1 Zellen zeigen aufgrund der morphologischen und funktionellen Unterschiede der beiden Zelllinien ein anderes Bild.

Monozyten und Makrophagen werden als integrale Bestandteile des angeborenen Immunsystems in Antwort auf die Ausschüttung chemotaktischer Faktoren vermehrt zu Infektions- und Entzündungsstellen rekrutiert. Diese haben nicht nur für die Erkennung, Eliminierung und Präsentation von Antigenen Bedeutung, sondern sind auch an der Regulation der Wundheilung, der Reorganisation von Geweben sowie der Tumordinvasion und -metastasierung beteiligt [UNANUE und ALLEN, 1987].

Makrophagen stammen von pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen ab, die über mehrere Stufen zu immunkompetenten Zellen ausdifferenzieren. Vorläufer sind im Blut zirkulierende Monozyten, die sich im Zuge der Einwanderung in Gewebe zu reifen Makrophagen entwickeln [WITSELL und SCHOOK, 1991].

In Zellkultur kann 24 Stunden nach PMA-induzierter Differenzierung eine Agglomeration monozytärer THP-1 Zellen, sowie nach 48 Stunden die Ausbildung von Pseudopodien beobachtet werden. Diese sind neben der Adhärenz ein wesentliches morphologisches Merkmal der nach 72 Stunden ausdifferenzierten THP-1 Makrophagen.

Die Adhärenz ist ein Stimulus, der nicht nur die Phagozytose reifer Makrophagen erleichtert, sondern auch maßgeblich an der Modulation der Protein- und Genexpression beteiligt ist [SPORN et al., 1990].

Den Ergebnissen des Differenzierungsverlaufes, sowie der ein- und vierstündigen Inkubationen mit TGF- β 1 und bLF zufolge, sind in THP-1 Monozyten keine Signale von p-Dab2 und β -Catenin detektierbar. In Übereinstimmung mit der Literatur wird die Expression von p-Dab2 und β -Catenin adhäsions-abhängig stimuliert. [ROSENBAUER et al., 2002; THIELE et al., 2001].

Da β -Catenin über den Abbau reguliert wird, kann mit zunehmendem Anteil adhärenter Zellen ab dem 24 Stunden Zeitpunkt ein Anstieg der β -Catenin-Level auf Proteinebene beobachtet werden. Auf transkriptioneller Ebene bleibt die Signalstärke in allen Differenzierungsstadien auf etwa gleichem Niveau.

Im Gegensatz zu Caco-2 Zellen wird p-Dab2 in differenzierten THP-1 Zellen auf Protein- und RNA-Ebene dramatisch hinaufreguliert. Rosenbauer et al. gehen

von einer wechselseitigen Regulation der Zelladhärenz und der Dab2-Expression aus. Dabei fördert eine verstärkte Expression von Dab2 die Integrin-vermittelte Adhärenz von Makrophagen und stimuliert als adhesion-responsive Phosphoprotein die Reorganisation des Zytoskeletts. Die Zelladhäsion induziert wiederum eine transiente Phosphorylierung von Dab2. Der molekulare Mechanismus, über welchen Dab-2 die Zelladhäsion beeinflusst ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [ROSENBAUER et al., 2002].

LRP-5, der als Co-Rezeptor im β -Catenin-abhängigen Wnt-Signaling fungiert, nimmt auf RNA-Ebene im Zuge der THP-1 Differenzierung um mehr als 60 % im Vergleich zu monozytären Zellen ab.

Ein struktureller Verwandter von LRP-5, LRP-1, wird wie p-Dab2 erst 48 Stunden nach Initiierung der Differenzierung auf Proteinebene bzw. ab dem 24 Stunden Zeitpunkt auf transkriptioneller Ebene verstärkt exprimiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten, konnte auch hier die Expression von LRP-1 sowie von CD-36 und MMP-9 erst nach Stimulierung der THP-1 Zelldifferenzierung nachgewiesen werden [SCHELCH, 2008; PRÖPPER, 2008].

In der Literatur gilt LRP-1 ebenso wie der Scavenger Rezeptor CD-36 [HUH et al., 1996], Endoglin [O'CONNELL et al., 1992] und MMP-9 [XIE et al., 1998a] als Differenzierungsmarker für Makrophagen [WATANABE et al., 1994].

Im Unterschied zu Caco-2 Zellen bleibt die Expression von Dab1, das als Adapterprotein unter anderem an LRP-1 bindet, auf Protein und RNA-Ebene in THP-1 Zellen völlig aus.

Die Ergebnisse der PCR-Analysen zeigen, dass auch die Expression von PAI-1 erst mit beginnender Zelladhäsion nach 24 Stunden induziert wird, wobei die Signalstärke über den Zeitraum der Differenzierung gleichmäßig bleibt. Laut Literatur wird die Expression von PAI-1 in Abhängigkeit der Zelladhäsion über den MEK/ERK-Pathway induziert [KUTZ et al., 2001; CHANG et al., 2003]. Hingegen steigt, den Ergebnissen des Differenzierungsverlaufes zufolge, die FN-1-Expression in Korrelation mit dem beobachteten Adhärenzverhalten zunehmend an. Nach Xie et al. spielt die Fibronektin-vermittelte Zelladhäsion

auch für die Induktion von MMP-9 im Verlauf der Makrophagendifferenzierung eine Rolle [XIE et al., 1998b].

Die Modulation der EZM erfolgt bei Monozyten und Makrophagen vor allem durch die Freisetzung von MMPs. Dabei werden hauptsächlich die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sezerniert. Generell ist die Expression von MMPs in Geweben gering, wird jedoch im Zuge der Restrukturierung der EZM, der Tumorinvasion und -metastasierung verstärkt induziert [OVERALL et al., 1991; LYNCH und MATRISIAN, 2002].

In Übereinstimmung mit Nguyen et al. ist auf RNA-Ebene kein MMP-9-Signal in THP-1 Monozyten detektierbar [NGUYEN et al., 2006]. Die Expression von MMP-2 nimmt, wie auch PCR-Analysen vorangegangener Arbeiten bereits zeigten, in differenzierten THP-1 Zellen zu [SCHELCH, 2008]. Nach Zhou et al. könnte die verstärkte Expression des Transmembranproteins CD147 für die zunehmende Aktivierung von MMPs wie MMP-9 und MMP-2 in ausdifferenzierten Zellen verantwortlich sein [ZHOU et al., 2005].

Es ist bekannt, dass MMP-9, MMP-2 und MMP-1 direkt oder indirekt mit LRP-1 interagieren [WEBB et al., 2000; EMONARD et al., 2004; SALMELA et al., 2004]. Da im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung ein transkriptioneller Anstieg von MMP-9, MMP-2 und MMP-1 ebenso wie von LRP-1 zu beobachten ist, kann eine Kopplung der Expressionslevel, wie bei Song et al. in Glioblastomen, nicht ausgeschlossen werden. MMP-2 und insbesondere MMP-9 werden auf transkriptioneller Ebene möglicherweise über einen ERK-abhängigen Pathway durch LRP-1 reguliert, wodurch die Zellmigration und -invasion gefördert wird [SONG et al., 2009].

Abgesehen von Zelltyp- und Differenzierungsgrad-abhängigen Expressionsmustern spiegelt die Aktivierung oder Hemmung der Expression verschiedener MMPs auch die signalvermittelte Regulation über den MAPK-, Smad- oder NF- κ B-Pathway wider.

MAPKinasen wie p38 und ERK1/2 spielen auch bei der Regulation von MMPs eine wichtige Rolle [SHIN et al., 2007]. Den Ergebnissen der Western Blot Analysen zufolge, wird der Aktivierungszustand von p38 im Verlauf der

Differenzierung um bis zu 90 % reduziert, während ERK1/2 auf mehr als das Fünfzehnfache zunimmt. Dabei erreicht die ERK1/2-Aktivierung wie bei MMP-2 zum 24 Stunden Zeitpunkt den Maximalwert.

Wie von Munshi et al. im Zusammenhang mit der Kontrolle der Proteinaseexpression bei Keratinozyten beschrieben, könnte auch in THP-1 Zellen eine reziproke Regulation der beiden MAPKinasen bestehen. Dabei begünstigt die Hemmung von p38 die Aktivierung von ERK1/2 und umgekehrt [MUNSHI et al., 2004].

Als besonderes Charakteristikum der THP-1 Zelldifferenzierung kann eine Umkehrung des Verhältnisses zwischen pERK1 und pERK2 im Zuge der Differenzierung beobachtet werden, wobei ab dem 48 Stunden Zeitpunkt pERK1 hinsichtlich der Signalstärke pERK2 überlegen ist.

Untersuchungen einer vorangegangenen Arbeit konnten bei LRP-1-defizienten Mef-Zellen ein deutlich schwächeres ERK1/2-Signal als beim Wildtyp sowie ein vergleichbares ERK1/2-Ratio wie bei THP-1 Monozyten zeigen [KAUPE, 2006]. Da auch im Verlauf der THP-1 Zelldifferenzierung LRP-1 ebenso wie pERK1/2 verstärkt exprimiert werden, könnte möglicherweise ein Zusammenhang zwischen den LRP-1- und pERK1/2-Leveln bestehen.

Ergebnisse einstündiger Inkubationen mit TGF- β 1 zeigen in beiden Differenzierungsstadien eine Verdoppelung des Aktivierungszustandes von p38 und ERK1/2. Hingegen konnte Laktoferrin in undifferenzierten THP-1 Zellen erst nach vier Stunden eine vergleichbar starke Stimulierung der beiden MAPKinasen wie TGF- β 1 induzieren. Im ausdifferenzierten Stadium konnte nach vier Stunden weder in Antwort auf TGF- β 1, noch auf Laktoferrin eine Reaktion festgestellt werden.

PCR-Analysen von im Smad-Pathway beteiligten Mediatoren zeigen, abgesehen von einer um etwa 60 % erhöhten Grundexpression von TGF- β 1 selbst, auf der Ebene der TGF- β -Rezeptorexpression einen Anstieg um mehr als 40 % bei Typ I sowie um etwa 30 % bei Typ II. Wie bereits bei Caco-2 Zellen diskutiert, kann auf RNA-Ebene keine Beeinträchtigung der TGF- β 1-abhängigen Signalvermittlung durch eine verminderte Rezeptorexpression festgestellt werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Differenzierungsverlaufes konnte auch nach Inkubationen von einer und vier Stunden mit TGF- β 1 und bLF in THP-1 Monozyten keine Aktivierung von Smad2 detektiert werden. Hingegen war auf transkriptioneller Ebene nach einstündiger Inkubation eine Stimulierung von PAI-1 durch TGF- β 1 sowie nach vier Stunden auch durch Laktoferrin nachweisbar. Nach Woodward et al. wird die TGF- β 1-induzierte Stimulierung von PAI-1 in Endothelzellen über die MAPKinasen MEK/ERK und p38 Ras-unabhängig vermittelt [WOODWARD et al., 2006]. Ebenso könnte PAI-1 auch in monozytären THP-1 Zellen Smad-unabhängig über den MAPK-Pathway aktiviert werden. Diese Hypothese ist allerdings noch durch Experimente mit spezifischen Inhibitoren zu bestätigen.

Ergebnisse des Differenzierungsverlaufes zeigen dagegen in differenzierten THP-1 Zellen ein mit β -Catenin vergleichbares Expressionsmuster von p-Smad2. Nach ein- und vierstündigen Inkubationen wird Smad2 in Antwort auf TGF- β 1 auf das Sechsfache des Kontrollwertes, jedoch kaum durch Laktoferrin, stimuliert. Im Gegensatz zu Caco-2 Zellen ist der TGF- β 1-induzierte Effekt nach einer Stunde ausgeprägter und fällt nach vier Stunden um ein Drittel ab.

Im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen kann auf RNA-Ebene bei THP-1 Makrophagen nach ein- und vierstündiger Inkubationszeit weder durch TGF- β 1 noch durch Laktoferrin eine Aktivierung typischer Zielgene festgestellt werden. Die PCR-Analysen bestätigen die Ergebnisse vorangegangener Immunfluoreszenzanalysen sowie einer Zellfraktionierung unserer Arbeitsgruppe, die bei differenzierten THP-1 Zellen keine Smad-Translokation in den Kern durch TGF- β 1 bzw. durch Laktoferrin nachweisen konnten [SCHELCH, 2008; PRÖPPER, 2008].

Da die Western Blot-Ergebnisse jedoch eine deutliche Responsivität differenzierter THP-1 Zellen gegenüber TGF- β 1 und Laktoferrin zeigen, kann daraus geschlossen werden, dass die Antwortfähigkeit nur teilweise verloren geht, während die Reaktion auf bestimmte Effekte bestehen bleibt [NICOLÁS und HILL, 2003]. Da die Dauer TGF- β 1-induzierter Signale ein bestimmender

Faktor für die Spezifität der Zellantwort ist, könnte nach Nicolas und Hill eine modulierte Signaldauer im Zuge der Tumorprogression eine veränderte bzw. fehlende Aktivierung nachgeschalteter Effektoren begründen. [NICOLAS und HILL, 2003].

Insgesamt kann wie in vorangegangenen Studien ein zum Teil vergleichbarer, aber auch gänzlich anderer Einfluss von bLF im Vergleich zu TGF- β 1 festgestellt werden. Die vermittelten Effekte hängen dabei nicht nur vom Zelltyp und Differenzierungsgrad, sondern auch von der Inkubationszeit und der jeweiligen Konzentration ab. Während die Aktivierung von Smad2 in Caco-2 Zellen mit steigender Konzentration von Laktoferrin zunimmt, werden die MAPKinasen p38 und ERK1/2 durch Laktoferrindosen von 0,5-5 μ g/ml maximal stimuliert. Konzentrationsabhängige Effekte von Laktoferrin konnten in der Literatur auch schon bei HUVEC Zellen gezeigt werden, wobei Laktoferrin die VEGF-vermittelte Phosphorylierung von ERK in einer Konzentration von 5 μ g/ml maximal stimulierte [KIM et al., 2006].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weitere Anhaltspunkte sowie potentielle Mediatoren auf, die bei der Regulation der Signaltransduktion durch TGF- β 1 und bLF eine Rolle spielen und zur Entschlüsselung Laktoferrin-induzierter, signalvermittelter Effekte beitragen könnten. Die vollständige Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen erfordert jedoch weiterführende Untersuchungen.

Ein möglicher Ansatz wäre der Einsatz eines Transwell-Systems, um den Einfluss der Zellpolarität auf die Antwortfähigkeit gegenüber bLF und TGF- β 1 in Caco-2 Zellen zu überprüfen. Zhang et al. konnten bereits in proximalen tubulären Epithelzellen eine deutlich höhere TGF- β 1-induzierte Aktivierung von R-Smads nach apikaler Stimulierung im Vergleich zur basolateralen Verabreichung nachweisen. Zudem konnte auch eine vermehrte Assoziation von Smadproteinen mit β -Catenin nach basolateraler TGF- β 1-Behandlung festgestellt werden [ZHANG et al., 2007].

6 ZUSAMMENFASSUNG

Laktoferrin ist physiologisch nicht nur als eisenbindendes Glykoprotein von Bedeutung, sondern erfüllt ebenso wie TGF- β 1 auf zellulärer Ebene zahlreiche regulatorische und immunmodulatorische Funktionen. Seit einigen Jahren steht Laktoferrin auch in unserer Arbeitsgruppe im Fokus der Forschung. Aufbauend auf Ergebnissen zuvor durchgeführter Studien wurden in dieser Arbeit mögliche Unterschiede in der Regulation der Signaltransduktion in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades, sowie in Antwort auf bovines Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 in enterozytären Caco-2 Zellen und humanen monozytären THP-1 Zellen analysiert. Der Einfluss von Laktoferrin auf diese beiden Zelllinien ist auch physiologisch relevant, da Laktoferrin nicht nur als zweithäufigstes Milchprotein mit der Dünndarmmukosa in Kontakt tritt, sondern auch als wesentliche Komponente der unspezifischen Abwehr vielfältige Wirkungen auf Immunzellen ausübt.

Analysen der Grundlevel spezifischer Proteine und Gene undifferenzierter und differenzierter Caco-2 und THP-1 Zellen zeigten eine modulierte Regulation in Abhängigkeit des Zelltyps und des Differenzierungsgrades. Als typisches Markerenzym differenzierter Caco-2 Zellen konnte ein Expressionsanstieg der Sucrase-Isomaltase festgestellt werden. Bei PAI-1 und c-Myc wurde dagegen ebenso wie bei p-Dab2 und den MAPKinasen p-p38 und pERK1/2 eine Abnahme der Signalstärke festgestellt. Auf der Ebene der Rezeptorexpression war nur bei β -Glycan, LRP-1 und Dab1 ein signifikanter Anstieg erkennbar. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigten die Ergebnisse von Kurzzeiteinkubationen eine beeinträchtigte bzw. keine Antwortfähigkeit postkonfluenter Caco-2 Zellen gegenüber TGF- β 1 und Laktoferrin, bestätigt durch den Verlust der Fähigkeit, spezifische nachgeschaltete Effektoren zu aktivieren. Dagegen wurden die untersuchten Mediatoren im subkonfluentem Stadium durch TGF- β 1 zeit- sowie durch Laktoferrin auch dosisabhängig stimuliert. Während das Niveau der Smad2-Aktivierung mit Erhöhung der Laktoferrinkonzentration auf bis zu 500 μ g/ml gesteigert wurde, erreichte der Aktivierungszustand von p38, ERK1/2 oder Dab2 bei Laktoferrindosen von

0,5 bzw. 5 µg/ml den Maximalwert. Monozytäre THP-1 Zellen differenzieren in vitro durch Zusatz des Phorbolesters PMA innerhalb von drei Tagen zu makrophagenähnlichen Zellen aus. 24 Stunden nach PMA-induzierter Differenzierung konnte mittels PCR-Analysen eine verstärkte Expression der Differenzierungsmarker CD-36, LRP-1, Endoglin und MMP-9 festgestellt werden. Ebenso war ein Anstieg der MMP-2- und MMP-9-Expressionslevel im Verlauf der THP-1 Differenzierung nachweisbar. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von PAI-1 oder FN-1 auf transkriptioneller Ebene sowie die Aktivierung von Smad2 oder β -Catenin auf Proteinebene erst mit zunehmendem Anteil adhärenter Zellen induziert wird. Die Signalstärke von LRP-5 und p-p38 wurde im Vergleich zu THP-1 Monozyten über den Zeitraum der Differenzierung dramatisch reduziert. Als besonderes Charakteristikum der THP-1 Zelldifferenzierung konnte nicht nur ein Anstieg der pERK1/2-Level, sondern auch eine Umkehrung des Verhältnisses von pERK1 und pERK2 beobachtet werden. Western Blot-Ergebnissen ein- und vierstündiger Inkubationen zufolge sind differenzierte THP-1 Zellen TGF- β 1- und Laktoferrin-responsive, entwickeln jedoch wie postkonfluente Caco-2 Zellen im Zuge der Differenzierung eine gewisse Resistenz. Dies bestätigten die Ergebnisse von PCR-Analysen, die in THP-1 Makrophagen keinen Einfluss von TGF- β 1 und Laktoferrin auf die untersuchten Gene zeigen konnten. In monozytären THP-1 Zellen war auf Proteinebene kein p-Smad2-Signal detektierbar, hingegen auf RNA-Ebene eine Stimulierung von PAI-1 durch TGF- β 1 und Laktoferrin nachweisbar. Da eine TGF- β 1- und Laktoferrin-abhängige Aktivierung der MAPKinasen festgestellt wurde, könnte PAI-1 möglicherweise Smad-unabhängig über den MAPK-Pathway stimuliert werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass bovines Laktoferrin ebenso wie TGF- β 1 in der Lage ist, zentrale Mediatoren des Smad-, MAPK- oder Wnt-/ β -Catenin-Pathway zu stimulieren. Der Zelltyp und Differenzierungsgrad erwiesen sich ebenso wie die eingesetzte Dosis und Inkubationszeit als bestimmende Faktoren für die vermittelten Effekte. Die durchgeführten Analysen liefern mögliche Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen, die zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen Laktoferrin-mediierter Effekte beitragen.

7 ABSTRACT

Lactoferrin is a glycoprotein which is, not only due to its iron-binding properties, physiologically important. At cellular levels, Lactoferrin as well as TGF- β 1 fulfils diverse regulatory and immunomodulatory functions. In recent years Lactoferrin has been the focus of intense research in our working group. Based on earlier analyses the purpose of this study was to investigate potential differences in the regulation of signal transduction depending on the state of differentiation as well as in response to Lactoferrin compared to TGF- β 1 in human enterocytic Caco-2 and monocytic THP-1 cells. The impact of Lactoferrin on these cell lines is physiologically relevant as Lactoferrin not only interacts with the intestinal mucosa as the second most abundant protein in milk but also exerts various effects on immune cells as an essential component of the innate immune system.

Analyses of protein and gene expression levels in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells showed an increase in the expression of the differentiation marker sucrase-isomaltase. In contrast PAI-1, c-Myc as well as p-Dab2 and the MAP kinases p-p38 and pERK1/2 were downregulated. On the level of receptor expression β -Glycan, LRP-1 and Dab1 were significantly upregulated. In accordance with literature, the results of short-term incubations revealed an attenuated or no reaction of postconfluent Caco-2 cells towards TGF- β 1 and Lactoferrin. This has been confirmed by the loss of the ability to stimulate specific downstream effectors. However, in Caco-2 cells at subconfluency the examined mediators were stimulated by TGF- β 1 in a time- as well as by Lactoferrin in a dose- and time-dependent manner. While concentrations of lactoferrin up to 500 μ g/ml led to enhanced activation of Smad2, the activation level of p38, ERK1/2 or Dab2 reached the maximum value at an optimal effective dose of 0,5 - 5 μ g/ml.

In vitro monocytic THP-1 cells differentiate after treatment with the phorbol ester PMA within three days into mature macrophages. 24 hours after PMA-induced differentiation an enhanced expression of the differentiation markers CD-36, LRP-1, Endoglin and MMP-9 was found by PCR analyses. Besides, expression

levels of MMP-2 and MMP-1 were elevated during the time course of differentiation. With an increasing number of adherent cells, Smad2 and β -catenin were elevated just as PAI-1 and FN-1 were expressed at transcriptional level. Compared to THP-1 monocytes the expression levels of LRP-5 and p-p38 were considerably reduced in THP-1 macrophages. Moreover differentiation experiments of THP-1 cells revealed not only an upregulation of pERK1/2 activation level but also a dramatic inversion in the pERK1/2 ratio. According to Western Blot analyses after 1 and 4 hours of incubation differentiated THP-1 cells have been proven to be TGF- β 1- and Lactoferrin-responsive. On the other hand THP-1 macrophages developed a partial resistance towards TGF- β 1 and Lactoferrin comparable to postconfluent Caco-2 cells and confirmed by PCR-analyses. In contrast no p-Smad2 signal could be detected in THP-1 monocytes, although PAI-1 has been stimulated by TGF- β 1 and Lactoferrin at transcriptional level. However, TGF- β 1 and Lactoferrin induced the activation of p38 and ERK1/2 which indicates that the MAPK-Pathway might be involved in the stimulation of PAI-1.

To sum up, results provide further evidence that just as TGF- β 1, bovine Lactoferrin is able to stimulate key mediators of the Smad-, MAPK- or Wnt-/ β -catenin-Pathway. The cell type, state of differentiation, period of incubation and dose could be identified as determining factors for the mediated effects. The findings provide new approaches to further elucidate underlying mechanisms of Lactoferrin-mediated effects.

V LITERATURVERZEICHNIS

AKHURST RJ, BALMAIN A. Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression. *J Pathol* 1999; 187 (1): 82-90.

AKHURST RJ, DERYNCK R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001; 11 (11): S44-51.

ANGEL P, HATTORI K, SMEAL T, KARIN M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 1988; 55 (5): 875-85.

ASHCROFT GS. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect* 1999; 1 (15): 1275-82.

AUWERX J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991; 47 (1): 22-31.

BAUVOIS B, ROUILLARD D, SANCEAU J, WIETZERBIN J. IFN-gamma and transforming growth factor-beta 1 differently regulate fibronectin and laminin receptors of human differentiating monocytic cells. *J Immunol* 1992; 148 (12): 3912-9.

BENNETT RM, KOKOCINSKI T. Lactoferrin content of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1978; 39 (4): 509-21.

BIRGENS HS, HANSEN NE, KARLE H, KRISTENSEN LO. Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *Br J Haematol* 1983; 54 (3): 383-91.

BLANCO FJ, SANTIBANEZ JF, GUERRERO-ESTEO M, LANGA C, VARY CP, BERNABEU C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 2005; 204 (2): 574-84.

BOSMA PJ, VAN DEN BERG EA, KOOISTRA T, SIEMIENIAK DR, SLIGHTOM JL. Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. *J Biol Chem* 1988; 263 (19): 9129-41.

BOTTALICO LA, WAGER RE, AGELLON LB, ASSOIAN RK, TABAS I. Transforming growth factor-beta 1 inhibits scavenger receptor activity in THP-1 human macrophages. *J Biol Chem* 1991; 266 (34): 22866-71.

BRODIN G, AHGREN A, TEN DIJKE P, HELDIN CH, HEUCHEL R. Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J Biol Chem* 2000; 275 (37): 29023-30.

BUCCIGROSSI V, DE MARCO G, BRUZZESE E, OMBRATO L, BRACALE I, POLITO G, GUARINO A. Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. *Pediatr Res* 2007; 61 (4): 410-4.

CAO C, LAWRENCE DA, LI Y, VON ARNIM CA, HERZ J, SU EJ, MAKAROVA A, HYMAN BT, STRICKLAND DK, ZHANG L. Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *EMBO J* 2006; 25 (9): 1860-70.

CHAKRABORTI S, MANDAL M, DAS S, MANDAL A, CHAKRABORTI T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253 (1-2): 269-85.

CHANG H, SHYU KG, LIN S, TSAI SC, WANG BW, LIU YC, SUNG YL, LEE CC. The plasminogen activator inhibitor-1 gene is induced by cell adhesion through the MEK/ERK pathway. *J Biomed Sci* 2003; 10 (6 Pt 2): 738-45.

CHANG L, KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410 (6824): 37-40.

CHANTRET I, BARBAT A, DUSSAULX E, BRATTAIN MG, ZWEIBAUM A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988; 48 (7): 1936-42.

CHEN CL, LIU IH, FLIESLER SJ, HAN X, HUANG SS, HUANG JS. Cholesterol suppresses cellular TGF-beta responsiveness: implications in atherogenesis. *J Cell Sci* 2007; 120 (Pt 20): 3509-21.

- CHEN CR, KANG Y, MASSAGUE J. Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (3): 992-9.
- CLEVERS H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127 (3): 469-80.
- CONNELLY OM. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr* 2001; 20 (5 Suppl): 389-395.
- DANG CV, RESAR LM, EMISON E, KIM S, LI Q, PRESCOTT JE, WONSEY D, ZELLER K. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res* 1999; 253 (1): 63-77.
- DATTO MB, LI Y, PANUS JF, HOWE DJ, XIONG Y, WANG XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92 (12): 5545-9.
- DAVIDSON G, WU W, SHEN J, BILIC J, FENGER U, STANNEK P, GLINKA A, NIEHRS C. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 2005; 438 (7069): 867-72.
- DE VISSER KE, KAST WM. Effects of TGF-beta on the immune system: implications for cancer immunotherapy. *Leukemia* 1999; 13 (8): 1188-99.
- DEDHAR S, WILLIAMS B, HANNIGAN G. Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signalling. *Trends Cell Biol* 1999; 9 (8): 319-23.
- DEDIEU S, LANGLOIS B. LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells. *Cell Adh Migr* 2008; 2 (2): 77-80.
- DENG G, CURRIDEN SA, HU G, CZEKAY RP, LOSKUTOFF DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Cell Physiol* 2001; 189 (1): 23-33.
- DENNLER S, GOUMANS MJ, TEN DIJKE P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 2002; 71 (5): 731-40.

DERIJARD B, HIBI M, WU IH, BARRETT T, SU B, DENG T, KARIN M, DAVIS RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; 76 (6): 1025-37.

DERYNCK R, AKHURST RJ, BALMAIN A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29 (2): 117-29.

DERYNCK R, FENG XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333 (2): F105-50.

DERYNCK R, ZHANG YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425 (6958): 577-84.

DONG Y, DRISSI H, CHEN M, CHEN D, ZUSCIK MJ, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ. Wnt-mediated regulation of chondrocyte maturation: modulation by TGF-beta. *J Cell Biochem* 2005; 95 (5): 1057-68.

EBISAWA T, FUKUCHI M, MURAKAMI G, CHIBA T, TANAKA K, IMAMURA T, MIYAZONO K. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001; 276 (16): 12477-80.

EMONARD H, BELLON G, TROEBERG L, BERTON A, ROBINET A, HENRIET P, MARBAIX E, KIRKEGAARD K, PATTHY L, EECKHOUT Y, NAGASE H, HORNEBECK W, COURTOY PJ. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2.TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279 (52): 54944-51.

ENGEL ME, MCDONNELL MA, LAW BK, MOSES HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* 1999; 274 (52): 37413-20.

ENGLE, M J, GOETZ, G S,ALPERS, D H. Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J Cell Physiol* 1998; 174 (3): 362-9.

FACCHINI LM, PENN LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J* 1998; 12 (9): 633-51.

FAZILI Z, SUN W, MITTELSTAEDT S, COHEN C, XU XX. Disabled-2 inactivation is an early step in ovarian tumorigenicity. *Oncogene* 1999; 18 (20): 3104-13.

FILLEBEEN C, DEXTER D, MITCHELL V, BENAÏSSA M, BEAUVILLAIN JC, SPIK G, PIERCE A. Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment. *Adv Exp Med Biol* 1998; 443 293-300.

FOGH J, FOGH JM, ORFEO T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59 (1): 221-6.

FULOP V, COLITTI CV, GENEST D, BERKOWITZ RS, YIU GK, NG SW, SZEPESI J, MOK SC. DOC-2/hDab2, a candidate tumor suppressor gene involved in the development of gestational trophoblastic diseases. *Oncogene* 1998; 17 (4): 419-24.

GERTLER FB, BENNETT RL, CLARK MJ, HOFFMANN FM. *Drosophila* abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled. *Cell* 1989; 58 (1): 103-13.

GILMORE TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25 (51): 6680-4.

GOLD LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 1999; 10 (4): 303-60.

GORDON MD, NUSSE R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006; 281 (32): 22429-33.

GOTTHARDT M, TROMMSDORFF M, NEVITT MF, SHELTON J, RICHARDSON JA, STOCKINGER W, NIMPF J, HERZ J. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem* 2000; 275 (33): 25616-24.

GRADL D, KUHL M, WEDLICH D. The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol* 1999; 19 (8): 5576-87.

GREY A, BANOVIC T, ZHU Q, WATSON M, CALLON K, PALMANO K, ROSS J, NAOT D, REID IR, CORNISH J. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 2004; 18 (9): 2268-78.

HALBLEIB JM, SAAF AM, BROWN PO, NELSON WJ. Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium in vitro. *Mol Biol Cell* 2007; 18 (11): 4261-78.

HAMMERSCHMID HB. Regulation der Zinktransporte in undifferenzierten und differenzierten CaCo2 Zellen. 2008.

HANNON GJ, BEACH D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371 (6494): 257-61.

HARA A, HIBI T, YOSHIOKA M, TODA K, WATANABE N, HAYASHI A, IWA O Y, SAITO H, WATANABE T, TSUCHIYA M. Changes of proliferative activity and phenotypes in spontaneous differentiation of a colon cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84 (6): 625-32.

HARTSOUGH MT, MULDER KM. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270 (13): 7117-24.

HAVERSEN L, OHLSSON BG, HAHN-ZORIC M, HANSON LA, MATTSBY-BALTZER I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol* 2002; 220 (2): 83-95.

HE J, SMITH ER, XU XX. Disabled-2 exerts its tumor suppressor activity by uncoupling c-Fos expression and MAP kinase activation. *J Biol Chem* 2001; 276 (29): 26814-8.

HE J, XU J, XU XX, HALL RA. Cell cycle-dependent phosphorylation of Disabled-2 by cdc2. *Oncogene* 2003; 22 (29): 4524-30.

HE TC, SPARKS AB, RAGO C, HERMEKING H, ZAWEL L, DA COSTA LT, MORIN PJ, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281 (5382): 1509-12.

HERZ J, STRICKLAND DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 2001; 108 (6): 779-84.

HIDALGO IJ, RAUB TJ, BORCHARDT RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96 (3): 736-49.

HOCEVAR BA, MOU F, RENNOLDS JL, MORRIS SM, COOPER JA, HOWE PH. Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). *EMBO J* 2003; 22 (12): 3084-94.

HOCEVAR BA, PRUNIER C, HOWE PH. Disabled-2 (Dab2) mediates transforming growth factor beta (TGFbeta)-stimulated fibronectin synthesis through TGFbeta-activated kinase 1 and activation of the JNK pathway. *J Biol Chem* 2005; 280 (27): 25920-7.

HOCEVAR BA, SMINE A, XU XX, HOWE PH. The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *EMBO J* 2001; 20 (11): 2789-801.

HONDA T, NAKAJIMA K. Mouse Disabled1 (DAB1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *J Biol Chem* 2006; 281 (50): 38951-65.

HOWELL BW, GERTLER FB, COOPER JA. Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J* 1997; 16 (1): 121-32.

HOWELL BW, HERRICK TM, COOPER JA. Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev* 1999; 13 (6): 643-8.

HU K, YANG J, TANAKA S, GONIAS SL, MARS WM, LIU Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 2006; 281 (4): 2120-7.

HUETTINGER M, RETZEK H, HERMANN M, GOLDENBERG H. Lactoferrin specifically inhibits endocytosis of chylomicron remnants but not alpha-macroglobulin. *J Biol Chem* 1992; 267 (26): 18551-7.

HUH HY, PEARCE SF, YESNER LM, SCHINDLER JL, SILVERSTEIN RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 1996; 87 (5): 2020-8.

IGNOTZ RA, MASSAGUE J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261 (9): 4337-45.

INOUE A, SATO O, HOMMA K, IKEBE M. DOC-2/DAB2 is the binding partner of myosin VI. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292 (2): 300-7.

JAKOWLEW SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25 (3): 435-57.

JAVELAUD D, MAUVIEL A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2005; 24 (37): 5742-50.

JAVELAUD D, MAUVIEL A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36 (7): 1161-5.

JEFFREY KL, CAMPS M, ROMMEL C, MACKAY CR. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6 (5): 391-403.

JIANG Y, PRUNIER C, HOWE PH. The inhibitory effects of Disabled-2 (Dab2) on Wnt signaling are mediated through Axin. *Oncogene* 2008; 27 (13): 1865-75.

JOHANSON B. Isolation of iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem. Scand.* 1960; 14 510-512.

JOHNSON GL, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298 (5600): 1911-2.

- KAMARAJU AK, ROBERTS AB. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280 (2): 1024-36.
- KARIN M, GRETEN FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5 (10): 749-59.
- KARIN M, LIU Z, ZANDI E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9 (2): 240-6.
- KAUPE I. Der Einfluss von Laktoferrin auf die Genexpression und die Signaltransduktion in einem arthritiden Chondrozytenmodell. 2006.
- KAVSAK P, RASMUSSEN RK, CAUSING CG, BONNI S, ZHU H, THOMSEN GH, WRANA JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 6 (6): 1365-75.
- KIM CW, SON KN, CHOI SY, KIM J. Human lactoferrin upregulates expression of KDR/Fik-1 and stimulates VEGF-A-mediated endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Lett* 2006; 580 (18): 4332-6.
- KIM SJ, IM YH, MARKOWITZ SD, BANG YJ. Molecular mechanisms of inactivation of TGF-beta receptors during carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11 (1-2): 159-68.
- KINGSLEY DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8 (2): 133-46.
- KRETZSCHMAR M, LIU F, HATA A, DOODY J, MASSAGUE J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997; 11 (8): 984-95.
- KRIEGER M, HERZ J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994; 63 601-37.

KUTZ SM, HORDINES J, MCKEOWN-LONGO PJ, HIGGINS PJ. TGF-beta1-induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion. *J Cell Sci* 2001; 114 (Pt 21): 3905-14.

LAIHO M, SAKSELA O, KESKI-OJA J. Transforming growth factor beta alters plasminogen activator activity in human skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 1986; 164 (2): 399-407.

LASTRES P, LETAMENDIA A, ZHANG H, RIUS C, ALMENDRO N, RAAB U, LOPEZ LA, LANGA C, FABRA A, LETARTE M, BERNABEU C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 1996; 133 (5): 1109-21.

LEGRAND D, ELASS E, CARPENTIER M, MAZURIER J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol* 2006; 84 (3): 282-90.

LEGRAND D, ELASS E, CARPENTIER M, MAZURIER J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62 (22): 2549-59.

LEGRAND D, PIERCE A, ELASS E, CARPENTIER M, MARILLER C, MAZURIER J. Lactoferrin structure and functions. *Adv Exp Med Biol* 2008; 606 163-94.

LETAMENDIA A, LASTRES P, BOTELLA LM, RAAB U, LANGA C, VELASCO B, ATTISANO L, BERNABEU C. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998; 273 (49): 33011-9.

LETTERIO JJ, ROBERTS AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16 137-61.

LI MO, WAN YY, SANJABI S, ROBERTSON AK, FLAVELL RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006a; 24 99-146.

LI TF, CHEN D, WU Q, CHEN M, SHEU TJ, SCHWARZ EM, DRISSI H, ZUSCIK M, O'KEEFE RJ. Transforming growth factor-beta stimulates cyclin D1 expression through activation of beta-catenin signaling in chondrocytes. *J Biol Chem* 2006b; 281 (30): 21296-304.

LIAO JH, CHEN JS, CHAI MQ, ZHAO S, SONG JG. The involvement of p38 MAPK in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Cell Res* 2001; 11 (2): 89-94.

LONNERDAL B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 2003; 77 (6): 1537-1543.

LYNCH CC, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70 (9-10): 561-73.

MAACKS S, YUAN HZ, WOOD WG. Development and evaluation of luminescence-based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in pediatric medicine. *J Biolumin Chemilumin* 1989; 3 (4): 221-226.

MACHNICKI M, ZIMECKI M, ZAGULSKI T. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int J Exp Pathol* 1993; 74 (5): 433-9.

MARIADASON JM, BORDONARO M, ASLAM F, SHI L, KURAGUCHI M, VELCICH A, AUGENLICHT LH. Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res* 2001; 61 (8): 3465-71.

MARIADASON JM, RICKARD KL, BARKLA DH, AUGENLICHT LH, GIBSON PR. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *J Cell Physiol* 2000; 183 (3): 347-54.

MARKOWITZ SD, ROBERTS AB. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7 (1): 93-102.

MASSAGUE J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1 (3): 169-78.

MASSAGUE J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6 597-641.

MASSAGUE J, BLAIN SW, LO RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103 (2): 295-309.

MASSAGUE J, CHEN YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000; 14 (6): 627-44.

MASSAGUE J, GOMIS RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 2006; 580 (12): 2811-20.

MASSAGUE J, WOTTON D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19 (8): 1745-54.

MASSON PL, HEREMANS JF, SCHONNE E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med* 1969; 130 (3): 643-58.

MASSOVA I, KOTRA LP, FRIDMAN R, MOBASHERY S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998; 12 (12): 1075-95.

MCDONALD PP, FADOK VA, BRATTON D, HENSON PM. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol* 1999; 163 (11): 6164-72.

MEILINGER M, HAUMER M, SZAKMARY KA, STEINBOCK F, SCHEIBER B, GOLDENBERG H, HUETTINGER M. Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor and transport to endosomes. *FEBS Lett* 1995; 360 (1): 70-4.

METZ-BOUTIGUE MH, JOLLES J, MAZURIER J, SCHOENTGEN F, LEGRAND D, SPIK G, MONTREUIL J, JOLLES P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem* 1984; 145 (3): 659-76.

MEUNIER V, BOURRIE M, BERGER Y, FABRE G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol* 1995; 11 (3-4): 187-94.

MIYAZONO K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11 (1-2): 15-22.

MOK SC, CHAN WY, WONG KK, CHEUNG KK, LAU CC, NG SW, BALDINI A, COLITTI CV, ROCK CO, BERKOWITZ RS. DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 1998; 16 (18): 2381-7.

MOK SC, WONG KK, CHAN RK, LAU CC, TSAO SW, KNAPP RC, BERKOWITZ RS. Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1994; 52 (2): 247-52.

MONTAGUT C, ROVIRA A, MELLADO B, GASCON P, ROSS JS, ALBANELL J. Preclinical and clinical development of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)* 2005; 41 (5): 299-315.

MORRIS SM, ARDEN SD, ROBERTS RC, KENDRICK-JONES J, COOPER JA, LUZIO JP, BUSS F. Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton. *Traffic* 2002; 3 (5): 331-41.

MORRIS SM, COOPER JA. Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic* 2001; 2 (2): 111-23.

MOUSTAKAS A, PARDALI K, GAAL A, HELDIN CH. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 2002; 82 (1-2): 85-91.

MUNSHI HG, WU YI, MUKHOPADHYAY S, OTTAVIANO AJ, SASSANO A, KOBLINSKI JE, PLATANIAS LC, STACK MS. Differential regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase activity by ERK 1/2- and p38 MAPK-modulated tissue inhibitor of metalloproteinases 2 expression controls transforming growth factor-beta1-induced pericellular collagenolysis. *J Biol Chem* 2004; 279 (37): 39042-50.

NAGASE H, WOESSNER JF. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1999; 274 (31): 21491-4.

NASSAR T, HAJ-YEHIA A, AKKAWI S, KUO A, BDEIR K, MAZAR A, CINES DB, HIGAZI AA. Binding of urokinase to low density lipoprotein-related receptor (LRP) regulates vascular smooth muscle cell contraction. J Biol Chem 2002; 277 (43): 40499-504.

NEELS JG, VAN DEN BERG BM, LOOKENE A, OLIVECRONA G, PANNEKOEK H, VAN ZONNEVELD AJ. The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. J Biol Chem 1999; 274 (44): 31305-11.

NGUYEN J, GOGUSEV J, KNAPNOUGEL P, BAUVOIS B. Protein tyrosine kinase and p38 MAP kinase pathways are involved in stimulation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human monocytes. Immunol Lett 2006; 106 (1): 34-41.

NICHOLL SM, ROZTOCIL E, DAVIES MG. Plasminogen activator system and vascular disease. Curr Vasc Pharmacol 2006; 4 (2): 101-16.

NICOLAS FJ, HILL CS. Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. Oncogene 2003; 22 (24): 3698-711.

NISHITA M, HASHIMOTO MK, OGATA S, LAURENT MN, UENO N, SHIBUYA H, CHO KW. Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. Nature 2000; 403 (6771): 781-5.

O'CONNELL PJ, MCKENZIE A, FISICARO N, ROCKMAN SP, PEARSE MJ, D'APICE AJ. Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted

OFT M, HEIDER KH, BEUG H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. Curr Biol 1998; 8 (23): 1243-52.

OH SM, HAHM DH, KIM IH, CHOI SY. Human neutrophil lactoferrin trans-activates the matrix metalloproteinase 1 gene through stress-activated MAPK signaling modules. J Biol Chem 2001; 276 (45): 42575-9.

OH SM, PYO CW, KIM Y, CHOI SY. Neutrophil lactoferrin upregulates the human p53 gene through induction of NF-kappaB activation cascade. *Oncogene* 2004; 23 (50): 8282-91.

OLEINIKOV AV, ZHAO J, MAKKER SP. Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *Biochem J* 2000; 347 Pt 3 613-21.

OVERALL CM, WRANA JL, SODEK J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 1991; 266 (21): 14064-71.

PASCHE B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* 2001; 186 (2): 153-68.

PAWSON T, SCOTT JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 1997; 278 (5346): 2075-80.

PESSAH M, PRUNIER C, MARAIS J, FERRAND N, MAZARS A, LALLEMAND F, GAUTHIER JM, ATFI A. c-Jun interacts with the corepressor TG-interacting factor (TGIF) to suppress Smad2 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (11): 6198-203.

PIEK E, HELDIN CH, TEN DIJKE P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 1999; 13 (15): 2105-24.

PINTO M, RUBINE-LEON S, APPAY MD, KEDINGER M, TRIADOU N, DUSSAULX E, LACROIX B, SIMON-ASSMANN P, HAFFEN K, FOGH J, ZWEIBAUM A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 1983; 47 323-330.

PRÖPPER K. Physiologische Relevanz der Laktoferrin-induzierten Signaltransduktion in THP-1 Zellen. 2008.

PRUNIER C, HOWE PH. Disabled-2 (Dab2) is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT). *J Biol Chem* 2005; 280 (17): 17540-8.

PUDDU P, VALENTI P, GESSANI S. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. *Biochimie* 2009; 91 (1): 11-8.

ROBINSON MJ, COBB MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9 (2): 180-6.

ROSENBAUER F, KALLIES A, SCHELLER M, KNOBELOCH KP, ROCK CO, SCHWIEGER M, STOCKING C, HORAK I. Disabled-2 is transcriptionally regulated by ICSBP and augments macrophage spreading and adhesion. *EMBO J* 2002; 21 (3): 211-20.

ROUSSEL MF, CLEVELAND JL, SHURTLEFF SA, SHERR CJ. Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling. *Nature* 1991; 353 (6342): 361-3.

SALINAS PC. Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends Cell Biol* 2007; 17 (7): 333-42.

SALMELA MT, PENDER SL, KARJALAINEN-LINDSBERG ML, PUOLAKKAINEN P, MACDONALD TT, SAARIALHO-KERE U. Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39 (11): 1095-104.

SANO Y, HARADA J, TASHIRO S, GOTOH-MANDEVILLE R, MAEKAWA T, ISHII S. ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 1999; 274 (13): 8949-57.

SCHELCH S. Signaltransduktion und Genexpression in der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 unter dem Einfluss von TGF- β und Laktoferrin. 2008.

SHARMA GD, HE J, BAZAN HE. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* 2003; 278 (24): 21989-97.

SHENG Z, SUN W, SMITH E, COHEN C, SHENG Z, XU XX. Restoration of positioning control following Disabled-2 expression in ovarian and breast tumor cells. *Oncogene* 2000; 19 (42): 4847-54.

- SHI Y, MASSAGUE J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113 (6): 685-700.
- SHIN CY, LEE WJ, CHOI JW, CHOI MS, PARK GH, YOO BK, HAN SY, RYU JR, CHOI EY, KO KH. Role of p38 MAPK on the down-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in rat astrocytes. *Arch Pharm Res* 2007; 30 (5): 624-33.
- SMITH ER, CAPO-CHICHI CD, HE J, SMEDBERG JL, YANG DH, PROWSE AH, GODWIN AK, HAMILTON TC, XU XX. Disabled-2 mediates c-Fos suppression and the cell growth regulatory activity of retinoic acid in embryonic carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276 (50): 47303-10.
- SONG H, LI Y, LEE J, SCHWARTZ A L, BU G. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Res* 2009; 69 (3): 879-86.
- SORIMACHI K, AKIMOTO K, HATTORI Y, IEIRI T, NIWA A. Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF-alpha, IL-8 and NO. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43 (1): 79-87.
- SPORN MB. TGF-beta: 20 years and counting. *Microbes Infect* 1999; 1 (15): 1251-3.
- SPORN SA, EIERMAN DF, JOHNSON CE, MORRIS J, MARTIN G, LADNER M, HASKILL S. Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J Immunol* 1990; 144 (11): 4434-41.
- STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17 463-516.
- SUZUKI Y A, LOPEZ V, LONNERDAL, B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62 (22): 2560-75.
- TAKATSU Y, NAKAMURA M, STAPLETON M, DANOS MC, MATSUMOTO K, O'CONNOR MB, SHIBUYA H, UENO N. TAK1 participates in c-Jun N-terminal

kinase signaling during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol* 2000; 20 (9): 3015-26.

TAKAYAMA Y, TAKAHASHI H, MIZUMACHI K, TAKEZAWA T. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is required for lactoferrin-enhanced collagen gel contractile activity of human fibroblasts. *J Biol Chem* 2003; 278 (24): 22112-8.

TAN C, COSTELLO P, SANGHERA J, DOMINGUEZ D, BAULIDA J, DE HERREROS AG, DEDHAR S. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2001; 20 (1): 133-40.

TEN DIJKE P, MIYAZONO K, HELDIN CH. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8 (2): 139-45.

TENG CT, BEARD C, GLADWELL W. Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat, and hamster. *Biol Reprod* 2002; 67 (5): 1439-49.

THALACKER FW, NILSEN-HAMILTON M. Specific induction of secreted proteins by transforming growth factor-beta and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Relationship with an inhibitor of plasminogen activator. *J Biol Chem* 1987; 262 (5): 2283-90.

THIELE A, WASNER M, MULLER C, ENGELAND K, HAUSCHILDT S. Regulation and possible function of beta-catenin in human monocytes. *J Immunol* 2001; 167 (12): 6786-93.

THORENS B, MERMOD JJ, VASSALLI P. Phagocytosis and inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in macrophages through posttranscriptional regulation. *Cell* 1987; 48 (4): 671-9.

TRACEY KJ, CERAMI A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994; 45 491-503.

TSENG CP, ELY BD, PONG RC, WANG Z, ZHOU J, HSIEH JT. The role of DOC-2/DAB2 protein phosphorylation in the inhibition of AP-1 activity. An underlying mechanism of its tumor-suppressive function in prostate cancer. *J Biol Chem* 1999; 274 (45): 31981-6.

TSUCHIYA S, KOBAYASHI Y, GOTO Y, OKUMURA H, NAKAE S, KONNO T, TADA K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 1982; 42 (4): 1530-6.

TSUCHIYA S, YAMABE M, YAMAGUCHI Y, KOBAYASHI Y, KONNO T, TADA K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26 (2): 171-6.

UNANUE E R, ALLEN PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 1987; 236 (4801): 551-7.

VAN WART HE, BIRKEDAL-HANSEN H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87 (14): 5578-82.

VOJTEK AB, COOPER JA. Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell* 1995; 82 (4): 527-9.

WAHL SM, ALLEN JB, WEEKS BS, WONG HL, KLOTMAN PE. Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (10): 4577-81.

WAHL SM, HUNT DA, WAKEFIELD LM, MCCARTNEY-FRANCIS N, WAHL LM, ROBERTS AB, SPORN MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84 (16): 5788-92.

WAKEFIELD LM, LETTERIO JJ, CHEN T, DANIELPOUR D, ALLISON RS, PAI LH, DENICOFF AM, NOONE MH, COWAN KH, O'SHAUGHNESSY JA, ET AL. Transforming growth factor-beta1 circulates in normal human plasma and is

unchanged in advanced metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 1995; 1:129-136.

WANG SC, MAKINO K, XIA W, KIM JS, IM SA, PENG H, MOK SC, SINGLETARY SE, HUNG MC. DOC-2/hDab-2 inhibits ILK activity and induces anoikis in breast cancer cells through an Akt-independent pathway. Oncogene 2001; 20 (47): 6960-4.

WARD PP, PAZ E, CONNEELY OM. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. Cell Mol Life Sci 2005; 62 (22): 2540-8.

WARD PP, URIBE-LUNA S, CONNEELY OM. Lactoferrin and host defense. Biochem Cell Biol 2002; 80 (1): 95-102.

WARNER BJ, BLAIN SW, SEOANE J, MASSAGUE J. Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. Mol Cell Biol 1999; 19 (9): 5913-22.

WATANABE Y, INABA T, SHIMANO H, GOTODA T, YAMAMOTO K, MOKUNO H, SATO H, YAZAKI Y, YAMADA N. Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. Arterioscler Thromb 1994; 14 (6): 1000-6.

WEBB DJ, NGUYEN DH, GONIAS SL. Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. J Cell Sci 2000; 113 (1): 123-34.

WILLNOW TE, GOLDSTEIN JL, ORTH K, BROWN MS, HERZ J. Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. J Biol Chem 1992; 267 (36): 26172-80.

WITSELL AL, SCHOOK LB. Macrophage heterogeneity occurs through a developmental mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88 (5): 1963-7.

WOODWARD RN, FINN AV, DICHEK DA. Identification of intracellular pathways through which TGF-beta1 upregulates PAI-1 expression in endothelial cells. Atherosclerosis 2006; 186 (1): 92-100.

- WU B, CRAMPTON SP, HUGHES CC. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 2007; 26 (2): 227-39.
- XIE B, LAOUAR A, HUBERMAN E. Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor necrosis factor- α via $\alpha 5 \beta 1$ integrin in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1998a; 273 (19): 11583-8.
- XIE B, LAOUAR A, HUBERMAN E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C- β . *J Biol Chem* 1998b; 273 (19): 11576-82.
- XU J, LAMOUILLE S, DERYNCK R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; 19 (2): 156-72.
- XU L, CHEN YG, MASSAGUE J. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGF β -dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2000; 2 (8): 559-62.
- XU XX, YANG W, JACKOWSKI S, ROCK CO. Cloning of a novel phosphoprotein regulated by colony-stimulating factor 1 shares a domain with the Drosophila disabled gene product. *J Biol Chem* 1995; 270 (23): 14184-91.
- XU XX, YI T, TANG B, LAMBETH JD. Disabled-2 (Dab2) is an SH3 domain-binding partner of Grb2. *Oncogene* 1998; 16 (12): 1561-9.
- YAMAGUCHI K, SHIRAKABE K, SHIBUYA H, IRIE K, OISHI I, UENO N, TANIGUCHI T, NISHIDA E, MATSUMOTO K. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction. *Science* 1995; 270 (5244): 2008-11.
- YAN C, BOYD DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007; 211 (1): 19-26.
- YANG DH, SMITH ER, ROLAND IH, SHENG Z, HE J, MARTIN WD, HAMILTON TC, LAMBETH JD, XU XX. Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 2002; 251 (1): 27-44.

YANG Z, STRICKLAND DK, BORNSTEIN P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* 2001; 276 (11): 8403-8.

YU L, HEBERT MC, ZHANG YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* 2002; 21 (14): 3749-59.

YUN M, KESHVARA L, PARK CG, ZHANG YM, DICKERSON JB, ZHENG J, ROCK CO, CURRAN T, PARK HW. Crystal structures of the Dab homology domains of mouse disabled 1 and 2. *J Biol Chem* 2003; 278 (38): 36572-81.

ZENG X, TAMAI K, DOBLE B, LI S, HUANG H, HABAS R, OKAMURA H, WOODGETT J, HE X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 2005; 438 (7069): 873-7.

ZHANG M, LEE CH, LUO DD, KRUPA A, FRASER D, PHILLIPS A. Polarity of response to transforming growth factor-beta1 in proximal tubular epithelial cells is regulated by beta-catenin. *J Biol Chem* 2007; 282 (39): 28639-47.

ZHOU J, HSIEH JT. The inhibitory role of DOC-2/DAB2 in growth factor receptor-mediated signal cascade. DOC-2/DAB2-mediated inhibition of ERK phosphorylation via binding to Grb2. *J Biol Chem* 2001; 276 (30): 27793-8.

ZHOU J, ZHU P, JIANG JL, ZHANG Q, WU ZB, YAO XY, TANG H, LU N, YANG Y, CHEN ZN. Involvement of CD147 in overexpression of MMP-2 and MMP-9 and enhancement of invasive potential of PMA-differentiated THP-1. *BMC Cell Biol* 2005; 6 (1): 25.

ZHOU M, ZHANG Y, ARDANS JA, WAHL LM. Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8. *J Biol Chem* 2003; 278 (46): 45406-13.

LEBENS LAUF

Sigrun BADRNYA

Adresse Marxergasse 19/23, 1030 Wien

Telefon +43 699 11 44 17 12

E-Mail sigrun.badrnya@chello.at

Geburtsdatum Wien, 24. Jänner 1981

Staatsangehörigkeit Österreich



SCHUL- UND BERUFSBILDUNG 10. 2001 – 10. 2009

Studium der Ernährungswissenschaften

Schwerpunkt: Ernährung und Umwelt

Universität Wien

1995 - 2000

HBLA für wirtschaftliche Berufe Wien XXI

Schwerpunkt: Fremdsprachen und Wirtschaft

1991 - 1995

BG und BRG Gänserndorf

1988 – 1991

Volksschule Marchegg

BERUFSERFAHRUNG UND

PRAKTIKA

seit 04. 2009

K. Landsteiner Inst. f. Zytokine und Tumor-Microenvironment

Abteilung Hämatologie/Hämostaseologie

Medizinische Universität Wien

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

07. 2008 – 07. 2009

Institut für Medizinische Chemie

Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie

Medizinische Universität Wien

Diplomandin

„Zytokinartige Wirkungen von Laktoterrin in verschiedenen Differenzierungsstadien von Caco-2 und THP-1 Zellen“

17.11. – 28.11. 2008; 03.06. – 18.06. 2009

Tutorium „Biochemische Übungen für Ernährungswissenschaftler“

1. 02. 2008 – 29. 02. 2008

Institut für Medizinische Chemie
Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie
Medizinische Universität Wien

Praktikantin

10. 2007 - 01. 2008

SIPCAN save your life

Special Institute for Preventive Cardiology And Nutrition, Salzburg

Projekt “Gesundes essen an Wiener Schulen”

Praktikantin

01. 02. 2007 - 28. 02. 2007

AKE – Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung, Wien

nutritionDay in European Hospitals 2007

Praktikantin

07. 2006 - 02. 2007

forum. ernährung heute

Fachzeitschriftenverlagsgesellschaft m.b.H., Wien

Praktikantin; Wissenschaftliche Mitarbeiterin

06. 03. 2006 - 02. 04. 2006

Tropenstation La Gamba, Costa Rica

„Korridor-Projekt“ im Regenwald der Österreicher

Praktikantin

SPRACHKENNTNISSE

Englisch: fließend in Wort und Schrift

Französisch: Grundkenntnisse

Spanisch: Grundkenntnisse

EDV-KOMPETENZEN

MS Office; APA^T CMS; Photoshop; SPSS; Prism., Internet

INTERESSEN

Bücher, Kino, Theater, Reisen

Mitglied der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung

Mitglied im Verein der Ernährungswissenschaftler Österreichs

Wien, Juli 2009